

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Mestrado em Biologia Animal**

**Diogo Antonio do Nascimento Doria**

**A IMPORTÂNCIA DO CÃO (*Canis familiaris*) NA EPIDEMIOLOGIA DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA (MINAS GERAIS,  
BRASIL)**

**Diamantina**

**2020**

**Diogo Antonio do Nascimento Doria**

**A IMPORTÂNCIA DO CÃO (*Canis familiaris*) NA EPIDEMIOLOGIA DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA (MINAS GERAIS,  
BRASIL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Biologia Animal da Universidade Federal dos  
Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Ricardo Andrade Barata

**Diamantina**

**2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D696i

Dória, Diogo Antonio do Nascimento

A importância do cão (*Canis familiaris*) na epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil)/ Diogo Antonio do Nascimento Dória, 2020.  
114 p.

Orientador: Ricardo Andrade Barata

Dissertação (Mestrado— Programa de Pós Graduação em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Saúde pública. 2. Zoonose. 3. Leishmaniose visceral. 4. *Canis familiaris*. I. Barata, Ricardo Andrade. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 616.959**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**DIOGO ANTÔNIO DO NASCIMENTO DÓRIA**

**A importância do cão (*Canis familiaris*) na epidemiologia da leishmaniose visceral no município de  
Diamantina (Minas Gerais, Brasil)**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade  
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível  
Mestrado, como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata

Data de aprovação: 09/12/2020.

Dr. Gustavo Fontes Paz  
(Instituto René Rachou/FIOCRUZ)

Dr. Alex Sander Dias Machado  
(Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri)

Dr. Ricardo Andrade Barata  
(Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri)

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai Geraldo, à minha mãe Maisa, ao meu irmão Henrique, à minha esposa Karine, ao meu filho Arthur e à toda minha família. Sempre de mãos dadas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, aos meus pais Maisa de Fatima Nascimento Doria e Geraldo Doria, ao meu irmão Henrique Jose do Nascimento Doria, a minha esposa Karine Lais de Souza, ao meu filho Arthur Souza Nascimento, aos Professores Dr. Ricardo Andrade Barata, Dr. Alex Sander Dias Machado e Dr. Gustavo Fontes Paz, aos colegas de trabalho da Vigilância Ambiental/Zoonoses de Diamantina-MG, Warlem Ferreira Cristianismo, Ernane dos Santos, Juliano Pedro da Silva, Luciana Miranda (Diretora de Vigilância em Saúde), Samuel Rosário, Denise Pinho Resille Pimenta (in memoriam) e aos demais colegas de trabalho que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

*Minha energia é o desafio, minha motivação é o impossível, e é  
por isso que eu preciso ser, à força e a esmo, inabalável.*

*Augusto Branco*

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença zoonótica emergente e negligenciada de grande importância na área da saúde pública devido ao seu intenso processo de expansão para áreas urbanas, especialmente em regiões mais carentes e desfavorecidas. No Brasil, é causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*, que é transmitido, principalmente, pela picada do vetor, o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo que o cão doméstico (*Canis familiaris*) apresenta um papel central na disseminação da doença para áreas urbanas. O objetivo deste estudo foi realizar um inquérito canino para LV e, a partir disso, avaliar a importância do cão e os aspectos relacionados à epidemiologia da LVC no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil). Em 2019, foram realizadas visitas técnicas sob demanda como rotina do Programa de Vigilância e Controle de Zoonoses do município, em toda área urbana e rural, a fim de coletar informações relacionadas ao cão e ao proprietário. Nestes animais, foi feito o teste DPP® e, em caso positivo foi realizado o teste ELISA, para diagnóstico confirmatório da LV. Os resultados mostraram que a frequência na área urbana foi de 24,3% enquanto na área rural foi de 21,9%, mostrando alta frequência nos bairros periféricos da cidade. Dentre os animais soropositivos, os cães considerados sintomáticos foram os mais frequentes com 83,5%. Em relação às características fenotípicas dos animais soropositivos, foi observado uma correlação significativa para o macho ( $p = 0,03$ ) e raça definida (RD) ( $p = 0,02$ ), revelando que o macho apresenta cerca de 41 vezes mais chance de adquirir LV do que as fêmeas, e, que os animais RD cerca de 46 vezes maior chance em relação aos sem raça definida (SRD). Além disso, animais de pelo curto (90,9%) apresentaram uma maior tendência de serem infectados em relação aos de pelo longo, sendo que as raças Pastor Alemão, Foxhound Americano, Pinscher e Labrador apresentaram maior frequência da LVC. Por meio da análise do sangue periférico por PCR, constatou-se que a espécie responsável pela LVC na região foi *Leishmania* sp. Os dados mostraram que o município de Diamantina apresenta elevada frequência da LVC e sugerem que a doença encontra-se em processo de urbanização, especialmente nos bairros periféricos. Neste estudo, foi apontado que sexo, raça e tipo de pelo podem ser fatores de risco da LVC, reforçando o papel do cão na cadeia de transmissão da doença e do risco de aumento dos casos humanos. Esses dados podem ser usados para um melhor planejamento de ações de prevenção, controle e vigilância, com maior enfoque nas áreas de risco da região.

**Palavras-chave:** Saúde pública, Zoonose, Leishmaniose Visceral, *Canis familiaris*



## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) or kala azar is an emerging and neglected zoonotic disease of great importance in public health due to its intense process of expansion into urban areas, especially in more deprived and disadvantaged regions. In Brazil, it is caused by the protozoan *Leishmania infantum chagasi*, which is transmitted mainly by the vector bite, the sand fly of the species *Lutzomyia longipalpis*, with the domestic dog (*Canis familiaris*) playing a central role in the spread of the disease to urban areas. The aim of this study was to conduct a canine survey for VL and, from there, to evaluate the importance of the dog and aspects related to the epidemiology of CVL in the municipality of Diamantina (Minas Gerais, Brazil). In 2019, technical visits were carried out on demand as a routine of the Zoonosis Surveillance and Control Program of the municipality, in all urban and rural areas, in order to collect information related to the dog and the owner. In these animals, the DPP® test was performed and, if positive, the ELISA test was performed for confirmatory diagnosis of CVL. The results showed that the prevalence in the urban area was 24.3% while in the rural area it was 21.9%, showing a high prevalence in the peripheral neighborhoods of the city. Among the seropositive animals, dogs considered symptomatic were the most frequent with 83.5%. In relation to the phenotypic characteristics of the seropositive animals, a significant correlation was observed for the male sex ( $p = 0.03$ ) and defined breed (RD) ( $p = 0.02$ ), revealing that the male has about 41 times more chance to acquire LVC than females, and that RD animals are about 46 times more likely than those with no defined breed (SRD). In addition, shorthaired animals (90.9%) showed a greater tendency to be infected compared to longhaired animals, with the German Shepherd, American Foxhound, Pinscher and Labrador breeds having a higher prevalence of CVL. Through the analysis of peripheral blood by PCR, it was found that the species responsible for CVL in the region was *Leishmania* sp. The data showed that the municipality of Diamantina has a high prevalence of CVL and that the disease is in urbanization process, especially in peripheral neighborhoods. In this study, it was pointed out that sex, race and type of hair may be risk factors for VL, reinforcing the role of the dog in the chain of transmission of the disease and the risk of increasing human cases. This data can be used for better planning of prevention, control, and surveillance actions, with a greater focus on risk areas in the region.

**Keywords:** Public health, Zoonosis, Visceral Leishmaniasis, *Canis familiaris*

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Morfologia das formas encontradas para espécies do gênero <i>Leishmania</i> .	20
Figura 2 – Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.	22
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. com indicação de outras formas de transmissão para canídeos.	24
Figura 4 – Representação esquemática das respostas imunológicas na determinação do desenvolvimento da Leishmaniose.	27
Figura 5 – Sinais clínicos comuns em animais com Leishmaniose Visceral Canina.	34
Figura 6 – Visitas domiciliares e o trabalho de campo no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.	44
Figura 7 – Formulário impresso para coleta de dados dos animais e de seus proprietários, no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.	45
Figura 8 – Teste rápido DPP® com reação positiva, realizada em animal no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.	47
Figura 9 – Localização geográfica dos casos de Leishmaniose visceral canina da área urbana da cidade de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) com identificação dos bairros acometidos no ano de 2019.	52
Figura 10 – Distribuição da frequência da Leishmaniose Visceral Canina de acordo com a sintomatologia dos cães residentes das áreas urbana e rural do município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	54
Figura 11 – Frequência dos sinais clínicos dos animais com Leishmaniose Visceral Canina, no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	55
Figura 12 – Distribuição dos animais com Leishmaniose Visceral Canina de acordo com o tipo de pelo (curto ou longo) e frequência de sintomatologia, no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	60

Figura 13 – Produtos de amplificação de DNA de cães, obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. 63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da frequência de Leishmaniose Visceral Canina na área urbana do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	50
Tabela 2 – Distribuição da frequência de Leishmaniose Visceral Canina na área rural do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	51
Tabela 3 – Distribuição da frequência dos casos de Leishmaniose Visceral Canina correlacionada com as características dos animais, do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	57
Tabela 4 – Análise multivariada pela Regressão de <i>Poisson</i> , com variância robusta, para animais com Leishmaniose Visceral Canina do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	58
Tabela 5 – Distribuição da ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina com relação à raça dos cães domiciliados no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.	61
Tabela 6 – Características dos animais (raça e tipo de pelo) associadas à frequência da Leishmaniose Visceral Canina, nas áreas urbana e rural do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.	62

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

C3b	Componente do complemento 3b
iC3b	Componente do complemento 3b inativado
C5	Componente do complemento 5
C9	Componente do complemento 9
CR3	Receptor do complemento tipo 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FUNED-MG	Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FML	Complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
gp63	Metaloproteinase
IBGE	Instituto Brasileiro de Estatística
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL 2	Interleucina 2
IL 4	Interleucina 4
IL 6	Interleucina 6
IL 10	Interleucina 10
IL 12	Interleucina 12
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MG	Minas Gerais
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

MS	Ministério da Saúde
NK	Linfócitos natural killer
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
RD	Raça Definida
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RF	Razão de Frequência
SRD	Sem Raça Definida
SES-MG	Secretária Estadual de Saúde de Minas Gerais
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> do tipo 2
TR DPP	Teste rápido de dupla migração
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
Km	Quilômetros
mL	Mililitros
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Etiologia .....	18
2.2 Ciclo biológico .....	19
2.3 Transmissão e vetor biológico .....	22
2.5 Patogenia e quadro clínico .....	24
2.5 Aspectos fenotípicos associados a incidência da LVC .....	31
2.6 Diagnóstico .....	33
2.7 Histórico e Epidemiologia .....	38
3 OBJETIVOS .....	42
3.1 Objetivo Geral .....	42
3.2 Objetivo Específico .....	42
4 METODOLOGIA .....	43
4.1 Área de estudo .....	43
4.2 Aspectos éticos .....	43
4.3 Análise do perfil fenotípico dos cães .....	44
4.4 Construção do mapa geo-espacial para identificação das áreas de risco .....	46
4.5 Realização do diagnóstico sorológico .....	46
4.6 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> circulante por PCR .....	47
4.7 Análises Estatísticas .....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
6 CONCLUSÕES .....	66
7 REFERÊNCIAS .....	67
ANEXO A – Artigo desenvolvido com os dados coletados no período de 2016 a 2018. ....	91



ANEXO B – E-mail com o aceite da revista ao Artigo desenvolvido com os dados coletados no período de 2016 a 2018. ....	112
--	-----

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções parasitárias de caráter primariamente zoonótico que pode acometer o homem, quando este, acidentalmente participa do ciclo de transmissão do parasito, passando a ser uma antroponose (BRASIL, 2006; MEGID *et al.*, 2018). Apresentam distribuição mundial, sendo endêmicas em grandes áreas dos trópicos, subtópicos e bacia do Mediterrâneo, incluindo mais de 98 países, com cerca de 12 milhões de casos da doença e 60.000 mortes por ano, e um total de 350 milhões de pessoas em risco (WHO 2010; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Essa doença apresenta distintas formas clínicas, dependendo da espécie de leishmania infectante e da resposta imune do hospedeiro (BANETH *et al.*, 2008; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). Nos seres humanos pode-se apresentar sob quatro formas clínicas, entre elas: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. Cada forma clínica da leishmaniose é dependente do agente etiológico e do estado imunológico do indivíduo, sendo que a leishmaniose visceral (LV) humana é caracterizada por ser uma doença crônica, sistêmica, com alta taxa de letalidade e de grande impacto na saúde pública e socioeconômica pela depleção da força de trabalho, sendo considerada uma doença negligenciada e em expansão para área urbana no Brasil (MATTOS-JR *et al.*, 2004; ROSYPAL, 2005; CARVALHO NETA *et al.*, 2007; BORASCHI & NUNES, 2007; ALMEIDA, 2009).

A LV humana, quando não tratada, pode apresentar uma taxa de 90% de óbitos, tendo como principal agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2017). Sendo demonstrada uma correlação positiva entre a incidência da LV humana e canina, mostrando que o cão tem um papel fundamental no aparecimento da doença humana (VIEIRA & COELHO, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2018). O tratamento da LV humana deve ser realizado o quanto antes, logo após confirmação diagnóstica da doença, sendo usado o antimonio N-metil glucamina como fármaco de primeira escolha, ou a anfotericina B lipossomal em situações clínicas específicas, além da associação terapêutica como hidratação, antibióticos, antieméticos e outros (BRASIL, 2017).

O animal de maior importância para manutenção e transmissão da doença para o homem é, sem dúvida, o cão doméstico (*Canis familiaris*) (STEINDEL *et al.*, 2013). Isso porque, o animal infectado pode encontrar-se clinicamente saudável (assintomático) por um longo período, de meses até anos, representando cerca de 40 a 60% dos animais soropositivos (SILVA

*et al.*, 2001; BRASIL, 2006; BARATA *et al.*, 2013), e assim, constitui um reservatório de fácil acesso ao vetor e continuação da propagação da doença (GONTIJO & MELO, 2004).

A leishmaniose visceral canina (LVC) ou calazar é uma doença sistêmica crônica progressiva de intenso parasitismo (CARVALHO-NETA *et al.*, 2007), e apesar de possíveis sinais cutâneos, quase todos os animais desenvolvem a forma visceral ou sistêmica da doença. Nas Américas, *Leishmania (L.) infantum* (ou *Leishmania (L.) chagasi*), é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral tanto canina quanto humana (QUINNELL *et al.*, 1997; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011), fazendo com que, em áreas urbanas, o cão seja o elo mais importante para a transmissão e disseminação dessa grave doença (FEITOSA *et al.*, 2000; CARVALHO-NETA *et al.*, 2007).

A transmissão do parasita das leishmanioses ocorre principalmente, através da picada do inseto pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, onde são reconhecidos seis gêneros, mas apenas dois têm importância médica: o gênero *Phlebotomus* para o Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (GRAMICCIA, 2011). No Brasil, a principal espécie vetor de *Leishmania infantum* é *Lutzomyia longipalpis*, díptero conhecido popularmente por mosquito-palha, birigui ou tatuquira. Possui hábitos noturnos e costuma se reproduzir em locais úmidos e ricos em matéria orgânica em decomposição (CIARAMELLA & CORONA, 2003; MADEIRA *et al.*, 2003; COSTA, 2011). Este vetor quando se alimenta de um animal infectado ingere o protozoário na forma amastigota que se transforma em promastigota metacíclica (forma infectante), e durante um novo repasto sanguíneo pode ser inoculado em novo hospedeiro, continuando o ciclo do parasito (ABRANTES & SILVEIRA, 2009; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

A LVC é de evolução lenta e início insidioso, na maioria das vezes, apresenta-se assintomática por longos períodos, em que as manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (BRASIL, 2006). Quando presentes, os sinais clínicos mais observados incluem sinais cutâneos, tais como hiperqueratose nasal, úlceras, pelagem seca e quebradiça, perda de pelos podendo ter alopecia, unhas anormalmente longas e/ou quebradiças (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). Por outro lado, os sinais viscerais mais comuns são linfadenopatia, emaciação, sinais de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, poliomiosite, anorexia, febre e esplenomegalia (TILLEY & SMITH-JR, 2008).

Devido à complexidade e gravidade da LVC, o diagnóstico precoce é fundamental para impedir a disseminação da doença para os humanos (MAIA & CAMPINO, 2008). Atualmente,

a detecção indireta do parasito pode ser feita por meio de testes rápidos, como o DPP®, exames sorológicos, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) e, moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Além destes, o diagnóstico pode ser realizado pela observação direta da forma amastigota do protozoário pela análise de esfregaço e isolamento em culturas (GONTIJO & MELO, 2004; MOHAPATRA *et al.*, 2014; DANTAS TORRES *et al.*, 2017).

Apesar das poucas opções de tratamento da LVC, a miltefosina pode ser empregada para o uso veterinário, visto que essa droga não é utilizada para o tratamento da doença humana (BRASIL, 2016a; LARSSON & LUCAS, 2016; REGUERA *et al.*, 2016), sendo de responsabilidade dos proprietários o uso do tratamento ou a eutanásia do animal infectado (BRASIL, 2016a). Vale ressaltar que, apesar do tratamento fornecer uma melhora clínica e diminuição da carga parasitária no animal, não o torna livre de ser reservatório, bem como não impede o retorno de alguns sinais clínicos (BANETH & SHAW, 2002; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003).

No Brasil, as medidas preconizadas pelo MS para o controle da leishmaniose visceral são: o controle dos vetores, diagnóstico e o tratamento de casos humanos e a eutanásia de cães infectados (BRASIL, 2006; ROMERO & BOELAERT, 2010; BARATA *et al.*, 2011a; 2011b). Este último, sempre muito doloroso e polêmico para os donos, e desta forma métodos de diagnóstico confiáveis são essenciais nesse processo de controle de reservatórios infectados (SOUZA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017a).

Além da eutanásia dos animais infectados, existem outras medidas relacionadas ao controle canino, no sentido de prevenção do seu adoecimento, evitando o contato do animal ao inseto vetor. Dentre essas medidas estão o uso do colar impregnado com deltametrina 4%; uso de inseticidas de aplicação tópica à base de permetrina; cuidados de limpeza do ambiente e remoção de matéria orgânica; aplicação semestral de inseticidas ambientais centrados nos cães à base de deltametrina e cipermetrina; uso de plantas repelentes de insetos como a citronela; não-realização de passeios ao ar livre em horários crepusculares ou noturnos. Alguns autores sugerem uma maior eficiência quando estas medidas são empregadas em conjunto (WERNECK *et al.*, 2002; RIBEIRO, 2007; BARATA *et al.*, 2011a; 2011b; ORLANDI, 2011; ANDRADE *et al.*, 2018).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários digenéticos pertencente ao Reino Protista, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia* (CUPOLILLO *et al.*, 2000; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Estes dois últimos se diferem quanto ao desenvolvimento inicial intravetorial do parasito, sendo no intestino anterior e médio para o sub-gênero *Leishmania* (complexos: *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. mexicana*) e no intestino posterior para o sub-gênero *Viannia* (complexos: *L. braziliensis* e *L. guyanensis*) (LAINSON & SHAW, 1998; SARIDOMICHELAKIS, 2009; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

As leishmanioses podem ser subdivididas em tegumentar (leishmaniose cutânea, mucocutânea e cutânea difusa) e a visceral ou calazar, sendo que para a primeira, as espécies pertencentes aos complexos *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* são as responsáveis pela doença na região da Europa, Ásia e África, enquanto nas Américas as espécies responsáveis são do complexo *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Para a LV, as espécies responsáveis pertencem ao complexo *L. donovani*, sendo *L. donovani* o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *L. infantum* na Ásia, Europa e África e *L. chagasi* nas Américas (FEITOSA *et al.*, 2000; CAMARGO *et al.*, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Alguns autores levantam teorias sobre a origem da LV nas Américas, entre elas se a doença foi introduzida recentemente, na época da colonização europeia e causada pela mesma espécie *L. infantum* vindo do Velho Mundo, ou se já ocorrem há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos e causada por outra espécie denominada *L. chagasi*. Alguns achados em canídeos originários da Amazônia, com altas taxas da doença sugerem a origem autóctone, bem como a grande diversidade observada de espécies de *Leishmania* nas Américas sustenta essa hipótese. Entretanto, outros estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram *L. chagasi* e *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de introdução pós-colonização, podendo essa espécie ser denominada *L. infantum chagasi* nas Américas (NOYES, 1998; MAURICIO *et al.*, 2000; GONTIJO & MELO, 2004; SARIDOMICHELAKIS, 2009; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Até o momento foram descritas cerca de 31 espécies, das quais aproximadamente 20 espécies são consideradas patogênicas para seres humanos e dessas, 10 espécies infectam tanto homens quanto canídeos. Nesta lista

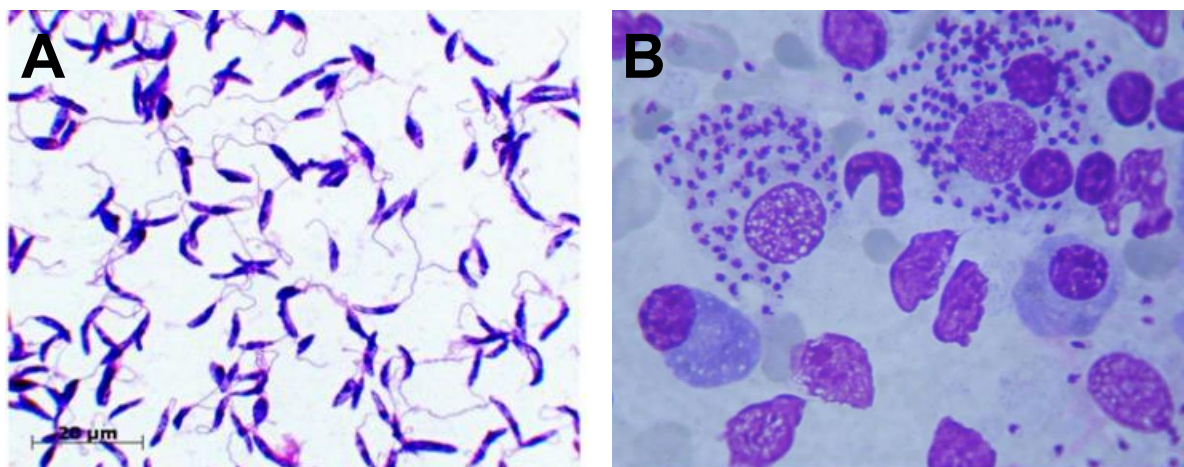
encontra-se *L. infantum* (*chagasi*), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* e *L. colombiensis*. Porém, a infecção canina mais amplamente distribuída mundialmente e bem caracterizada da LV é causada pela *L. infantum chagasi* (SARIDOMICHELAKIS, 2009; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

## 2.2 Ciclo biológico

As leishmanias são protozoários unicelulares pleomórficos caracterizadas pela presença de um núcleo e um cinetoplasto intracelular, que corresponde ao DNA mitocondrial (GRAMICCIA, 2011), apresenta reprodução assexuada por divisão binária e ciclo de vida heteroxênico (digenético), ou seja, desenvolvem-se em dois hospedeiros diferentes e se apresentam sob duas formas de desenvolvimento (ALCOLEA *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011). As duas formas morfológicas principais são promastigota (Figura 1A) e a forma amastigota (Figura 1B) (NEVES *et al.*, 2011; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

As formas promastigotas são extracelulares, móveis e alongadas, medindo entre 14 - 20 µm, apresentam um único núcleo, com formato arredondado ou oval. O cinetoplasto é anterior ao núcleo e o flagelo longo (cerca de 30 µm) torna-se livre a partir da porção anterior da célula. No intestino do vetor podem ser encontradas duas formas promastigotas, as formas multiplicativas não infectantes denominadas de promastigotas procíclicas, e as formas não multiplicativas e infectantes denominadas promastigotas metacíclicas, estas últimas são encontradas na parte anterior do intestino e na probóscide dos flebotomíneos. A forma metacíclica possui diâmetro do corpo menor e flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo. Já a forma amastigota são células intracelulares obrigatórias que se encontram em vacúolos de células do sistema mononuclear fagocítico (macrófagos) dos hospedeiros vertebrados. Apresentam morfologia ovalado a esférico, com diâmetro variando de 3 – 6.5 µm, não há flagelo livre, com somente um rudimento encontrado no interior da bolsa flagelar, apresenta núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (HATAM *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2011).

**Figura 1** – Morfologia das formas encontradas para espécies do gênero *Leishmania*.



A – Forma promastigota de *Leishmania*, ampliação de 100x e coloração Giemsa (Fonte: DE SOUZA, 2014); B – Forma amastigota de *Leishmania*, ampliação de 100x e coloração Giemsa (Fonte: SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

A principal forma de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado. A saliva do inseto possui componentes biológicos ativos, como anticoagulante, vasodilatadores e antiagregante plaquetário, que favorecem o fluxo de sangue, o acúmulo linfático no local da picada facilitando o repasto sanguíneo. Além disso, apresentam fatores com ação quimiotática para monócitos e neutrófilos, aumentando sua proliferação e impedindo sua ação efetora na destruição dos parasitos (BESTEIRO *et al.*, 2007). Essa estratégia também conhecida como “cavalo-de-Tróia”, consiste na alta quimiotaxia dos neutrófilos para região da picada onde essas células como a primeira linha de defesa realizam a fagocitose dos parasitas. Porém, como essas células apresentam curto tempo de vida (poucas horas), os neutrófilos repletos de parasitos entram em apoptose e são digeridos pelos macrófagos, onde os parasitos vivos se convertem em amastigotas que apresentam sistemas de escape da ação lítica dos macrófagos, conseguindo se reproduzir continuamente (PETERSEN *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2011)

O ciclo de vida (Figura 2) consiste na ingestão de macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* sp. durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo. Estes parasitos rompem as células e sofrem processo de multiplicação e diferenciação em formas promastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio até sua diferenciação nas formas promastigotas metacíclicas, a forma infectante.

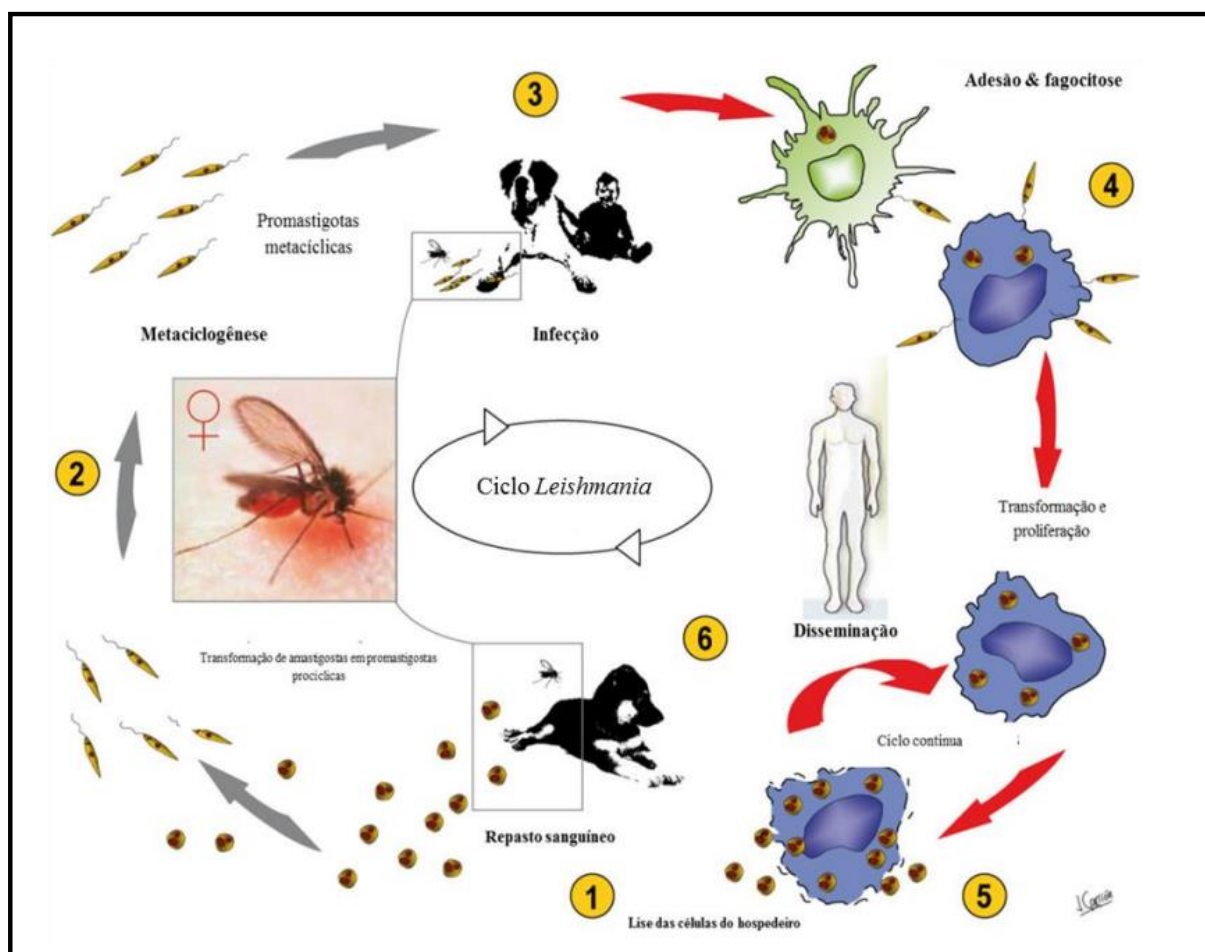
Durante um novo repasto sanguíneo, o flebótomo infectado realiza a inoculação de formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, que

por vários sistemas de evasão, escapam do mecanismo de defesa e parasitam as células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dessas células, os parasitos na forma amastigota, se multiplicam intensamente por divisão binária, tornando os macrófagos desvitalizados até sua ruptura e liberação das formas amastigotas, que são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Assim, ocorre sua disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, o baço e a medula óssea dentro das primeiras horas (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007; NEVES *et al.*, 2011).

Além do cão doméstico, outros animais silvestres podem servir como reservatório natural das leishmanias, tais como carnívoros das espécies *Lycalopex vetulus* (raposa-do-mato) e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Canis aureus* (chacal-dourado), *Canis lupus* (lobo-cinzento), marsupiais do gênero *Didelphis* (gambá), roedores das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana), *Mesocricetus auratus* (hamster sírio) e outros. Em alguns estudos também apontam que o cavalo e o gato também podem ser acometidos pela LV (DANTAS TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006; DANTAS TORRES, 2007; CAMARGO *et al.*, 2007; SERRANO *et al.*, 2008). A infecção no gato doméstico (*Felis catus*) tem sido encontrada em países como Portugal, França, Espanha, Itália, Argélia, Brasil, Estados Unidos e outros (COELHO *et al.*, 2010; TRAINOR *et al.*, 2010), mas ainda não se conhece a situação desta espécie como reservatório deste parasito (MAIA & CAMPINO, 2011).



**Figura 2** – Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania* sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.



Fonte: VIANA, 2016

### 2.3 Transmissão e vetor biológico

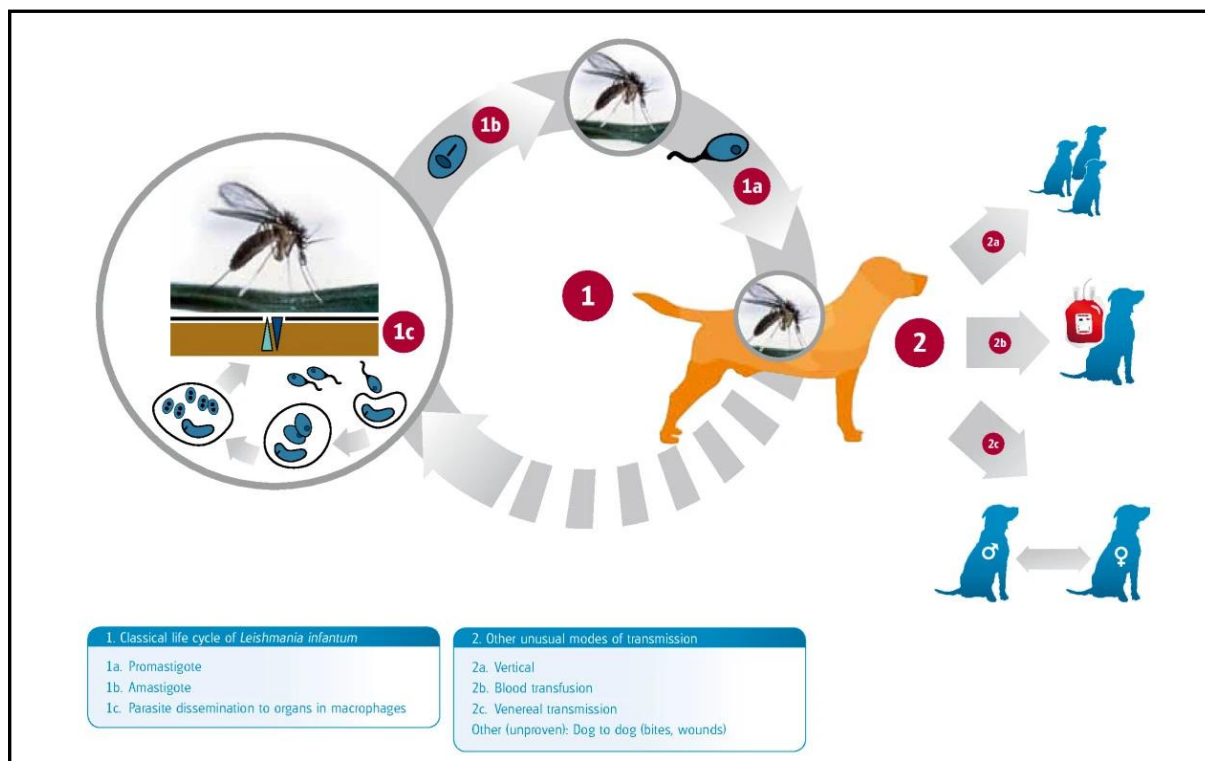
Os vetores implicados na transmissão do parasita das leishmanioses pertencem à Classe Insecta, Subclasse Pterygota, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae. Dentro da subfamília, dois gêneros apresentam importância médica, o gênero *Phlebotomus* na região do Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (LAINSON & SHAW, 1978; GRAMICCIA, 2011). São insetos dípteros, de dois a três milímetros recobertos de pelos, apresentam cor castanha ou acinzentada, aparelho bucal longo e podem viver entre duas a seis semanas (AFONSO & ALVES-PIRES, 2008; WHO, 2014). Tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de sucos vegetais ou de outros insetos (AFONSO & ALVES-PIRES, 2008), porém as fêmeas são hematófagas obrigatórias, apresentam hábitos ecléticos podendo realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados (BRASIL, 2006;

MAROLI *et al.*, 2013). Os locais preferenciais do repasto sanguíneo são o focinho, pálpebras, pavilhão auricular, dorso, coxas e dígitos dos animais (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2009).

A distribuição geográfica destes insetos depende do tipo de vegetação, clima, umidade, composição dos solos e presença de matéria orgânica. Apresentam maior atividade em temperaturas entre 15°C e 28°C, associadas a umidades relativas altas, ocorrendo o ano todo nas regiões tropicais e subtropicais, como no Brasil (SHARMA & SINGH, 2008). Podem percorrer longas distâncias (até 2.5 km/noite), tendo maior atividade no período crepuscular ou noturno e apresentam fototropismo positivo. São encontrados frequentemente no peridomicílio, em locais como galinheiros, chiqueiros e canis, mas atualmente também tem sido encontrado no intradomicílio. Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos na terra, em lugares úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa luminosidade. O desenvolvimento dos ovos passa por quatro estágios (ovo, larva, pupa e adulto) com duração média de 36 dias (FEITOSA *et al.*, 2000; BRASIL, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; AFONSO & ALVES-PIRES, 2008).

A principal espécie transmissora da LV nas Américas é *Lutzomyia longipalpis*. Outras espécies também foram relatadas como agentes transmissores de LV em algumas regiões do Brasil, tais como *Lutzomyia intermedia* no litoral do município do Rio de Janeiro e *Lutzomyia cruzi* no Mato Grosso do Sul (SHARMA & SINGH, 2008; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Além da transmissão vetorial, existem outros possíveis mecanismos de transmissão (Figura 3), como transfusão de sangue ou produtos sanguíneos de animais infectados (OWENS *et al.*, 2001; DE FREITAS *et al.*, 2006; TABAR *et al.*, 2008), de forma vertical (ROSY PAL *et al.*, 2005; PANGRAZIO *et al.*, 2009; BOGGIATTO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012) e venérea, sendo somente do macho para a fêmea (DINIZ *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009; NAUCKE & LORENTZ, 2012). Alguns estudos também apontam que artrópodes hematófagos como pulgas (*Xenopsylla* spp.) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) podem ser potenciais vetores na transmissão de *L. infantum chagasi*, mas ainda não existe um consenso para essa forma de transmissão (COUTINHO *et al.*, 2005; DANTAS TORRES *et al.*, 2010; PAZ *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2012; SLAMA *et al.*, 2014).

**Figura 3** – Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania* sp. com indicação de outras formas de transmissão para canídeos.



Fonte: SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011

## 2.5 Patogenia e quadro clínico

A doença causada por *Leishmania* spp. nos cães é clinicamente semelhante à doença humana, caracterizada por doença crônica, sistêmica e fatal (LINHARES *et al.*, 2005; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2019). Geralmente, os cães acometidos apresentam, além das lesões viscerais, lesões cutâneas em cerca de 50 a 90% dos casos (SILVA, 2007; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; SALZO, 2008), uma vez que os parasitos disseminam por todo o organismo por via hematogênica e linfática através dos fagócitos mononucleares (MELO, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). Assim como a doença humana, a gravidade da doença e o aparecimento dos sinais clínicos variam do aparente estado sadio a um severo estado terminal (BRASIL, 2015), dependendo da resposta imune do animal infectado e da cepa do parasito (MICHALICK & GENARO, 2005; SILVA *et al.*, 2019).

Os animais podem ser classificados em sintomáticos ou assintomáticos (BRASIL, 2006; FONTES & SILVA, 2011). Os assintomáticos não apresentam nenhum sinal clínico aparentando serem clinicamente saudáveis por um período variável. Já os animais sintomáticos

apresentam vários sinais característicos da LVC, levando a morbidade progressiva e, muitas vezes a morte do animal (REIS *et al.*, 2009).

A infecção parasitária pode acometer diferentes tipos de células, incluindo os macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e eosinófilos e assim, invadir quase todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central. Embora a infecção das células não fagocíticas possa contribuir para a sobrevivência do parasito a longo prazo, os fagócitos mononucleares, especialmente os macrófagos, são consideradas as principais células hospedeiras do parasito (PETERSEN *et al.*, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009; NEVES *et al.*, 2011).

O processo de infecção inicia após a inoculação das promastigotas na derme, onde provoca uma reação inflamatória localizada com presença de células do sistema imune inato como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Esse processo é acentuado também devido à ação dos componentes biológicos ativos presente na saliva do vetor, que atuam como agente quimiotático, além de atuarem como imunomoduladores provocando a inibição da produção de citocinas da via linfócitos T *helper* do tipo 1 (Th1), como interleucina 12 (IL 12) e interferon gama (IFN  $\gamma$ ), redução do estresse oxidativo e ação proliferativa em macrófagos (ANDRADE *et al.* 2007; ROHOUSOVÁ & VOLF 2006; BESTEIRO *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2011).

Além disso, as leishmanias apresentam mecanismos de escape à lise direta via complemento devido à presença de glicoproteínas e açúcares da membrana, o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloproteinase gp63, respectivamente (TURCO *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2003). Essas moléculas atuam na fosforilação e inativação dos componentes C3b, C5 e C9, com a consequente inibição das vias clássica e alternativa do complemento. A LPG também protege o parasito contra o estresse oxidativo por meio do retardo da formação do lisofagossomo após sua interiorização nos macrófagos. Já a gp63 acarreta a aceleração da conversão proteolítica na superfície do parasito do C3b para iC3b (fragmento inativo) que funciona como uma opsonina, facilitando a ligação com receptores do complemento tipo 3 (CR3) nos macrófagos e sua internalização (BOGDAN *et al.*, 1996; BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998; NEVES *et al.*, 2011).

As infecções por *Leishmania* levam a uma ativação específica do sistema imunológico por parte do hospedeiro, sendo que esta promove uma expansão de vários tipos de células, caracterizada principalmente por linfócitos T CD4+, apresentando um perfil de citocinas do tipo 1 (Th1 - resposta celular) e/ou do tipo 2 (Th2 - resposta humoral) (HOLZMULLER *et al.*,

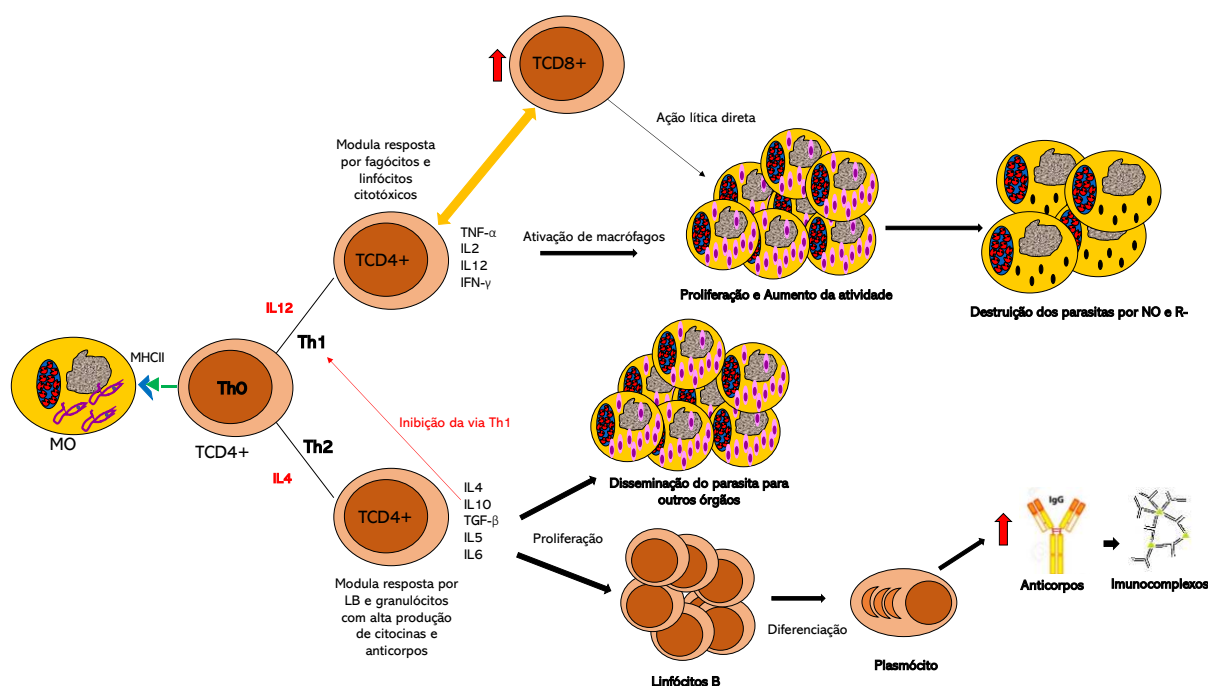
2006; REIS *et al.*, 2006). Até o momento, tem sido observado que quando a resposta tende para Th1, com produção das citocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2), IL-12 e IFN- $\gamma$ , ocorre uma ativação de macrófagos e estimulação a produção de óxido nítrico (NO), com destruição acentuada dos parasitos intracelulares (VOULDOUKIS *et al.*, 1996; BANETH *et al.*, 2008; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). Essa resposta caracteriza uma resistência à infecção, onde o animal, geralmente não apresenta os sinais clínicos da doença, podendo alcançar a cura espontânea (PINELLI *et al.*, 1995; 1999; BRASIL, 2006; NEVES *et al.*, 2011). Tem sido sugerido que cães com resposta imunitária mediada pelas células T CD4+, pela via celular, são provavelmente capazes de evitar a disseminação do parasito para superfície mucosa e, produzem menores níveis de Imunoglobulina A (IgA) específica, reconhecida como a principal imunoglobulina componente do sistema imunitário de mucosas (RODRIGUEZ CORTES, 2007).

Enquanto, uma resposta Th2 ocorre a produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que inibem a resposta Th1, interferindo na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , diminuem a ativação dos macrófagos e inibem a produção de óxido nítrico (CUNNINGHAM, 2002; LIMA *et al.*, 2003). Além disso, estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos que desencadeia a produção elevada de anticorpos específicos contra *Leishmania*, observado nos elevados títulos de Imunoglobulina G (IgG) (TRUJILLO *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 2011). Essa intensa proliferação e diferenciação dos linfócitos B e a produção abundante de anticorpos, tem efeito deletério e não protetor (BRASIL, 2006). A *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizando uma das estratégias de escape do parasito para persistência da infecção, causando a forma sintomática da doença nos animais infectados (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998; ROGERS *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2006; SILVA, 2007).

Na resposta tipo Th2, foi visto que ocorre a produção elevada de imunoglobulinas, sendo elas Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina E (IgE) e, especialmente subclasses de IgG durante a doença (ATTA *et al.*, 2004). Foi demonstrado que IgG não apenas falha no fornecimento de proteção contra o parasita intracelular, mas contribui para a progressão da doença. Miles *et al.* (2005) observaram que a administração passiva de IgG anti-*Leishmania* causou o aparecimento de grandes lesões em camundongos BALB/c com intensa produção de IL-10. Alguns autores discordam quanto ao papel de algumas classes de IgG na resposta ao parasita (REIS, 2001; INIESTA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005). Onde a subclasse de

IgG1 anti-*Leishmania* foi associada ao aparecimento de sinais clínicos, enquanto a subclasse IgG2 estava associada a cães assintomáticos (INIESTA *et al.*, 2005). No entanto, outros autores observaram que na LVC, os animais assintomáticos possuíam níveis elevados de IgG1, que reduziam à medida que havia progressão dos sinais, e que níveis elevados de IgG2 estariam associados com a gravidade dos sinais clínicos e morbidade da doença (REIS, 2001; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2005). Assim, as hipóteses de susceptibilidade e resistência associadas à produção de anticorpos específicos IgG1 e IgG2 ainda não foi confirmada (QUINNELL *et al.*, 2003). Mas esses dois anticorpos anti-*Leishmania* têm sido utilizadas como marcadores de evolução clínica da LVC, sendo consideradas mais confiáveis que a determinação de IgG total (DESPLAZES *et al.*, 1995; SHARMA & SINGH, 2009). Na figura 4 está representado um esquema das respostas imunológicas na LVC.

**Figura 4** – Representação esquemática das respostas imunológicas na determinação do desenvolvimento da Leishmaniose.



**Legenda:** IL 2: interleucina 2; IL 4: interleucina 4; IL 5: interleucina 5; IL 6: interleucina 6; IL 10: interleucina 10; IL 12: interleucina 12; TCD4+: linfócito T CD4+; TCD8+: linfócito T CD8+; TGF-β: fator de transformação do crescimento beta; Th1: linfócitos T *helper* do tipo 1; Th2: linfócitos T *helper* do tipo 2; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; MO: macrófago; NO: óxido nítrico; R-: radicais livres de oxigênio. Fonte: Próprio autor.

Alguns estudos mostraram que a IL-12 é a principal citocina indutora da resposta celular, indicando que essa citocina tem participação no processo de resistência à doença (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). Essa citocina é produzida por células dendríticas e macrófagos, que atua diretamente na diferenciação dos linfócitos T indiferenciados, em células do tipo Th1 induzindo aumento da produção de IFN- $\gamma$  tanto pelas células T CD4+ quanto linfócitos natural killer (NK) (CUNNINGHAM 2002). A principal função das Th1 é a defesa mediada por fagócitos, especialmente no combate a micro-organismos intracelulares. Já a resposta humoral, é a IL-4 que regula a diferenciação de células Th2, além disso, as reações imunes mediadas por IgE e pelos eosinófilos/mastócitos também contribuem para este tipo de resposta (HAILU *et al.*, 2005). Outra citocina importante na Th2 é a IL-10, que atua na inibição da ativação dos macrófagos, por meio da redução da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (iNO), redução da expressão de moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e moléculas de adesão intercelular, reduzindo a habilidade dessas células em destruir o parasita (DING *et al.*, 1993; BOURREAU *et al.*, 2001; VARELLA & FORTE, 2001).

Os linfócitos T CD8+ (citotóxicos) parecem desenvolver um papel importante no processo de cura e/ou resistência na LVC. Alguns autores sugerem que sua ação possa estar relacionada a modulação da atividade de células T CD4+, com estimulação da produção de citocinas da via Th1, ou possivelmente via efeito citolítico direto em macrófagos infectados, representando então um mecanismo adicional na resistência à infecção (DA CRUZ *et al.*, 1994; PINELLI *et al.*, 1995; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; FREITAS & PINHEIRO, 2010). Antes do tratamento quimioterápico foi observado que os animais apresentavam maior proliferação de células T CD4+, enquanto que no final do tratamento, com a melhora do quadro clínico essa população era reduzida, com concomitante aumento de células T CD8+, sugerindo uma maior participação das células T citotóxicas nos processos de cura (DA CRUZ *et al.*, 1994; SCOTT *et al.*, 2004; SCOTT, 2005). Bem como em cães assintomáticos, esses linfócitos são normalmente detectados em maior proporção do que nos cães sintomáticos (PINELLI *et al.*, 1995), mostrando que a elevação na frequência de linfócitos T CD8+ específicos para *Leishmania* está associada a resistência e/ou cura da LVC, podendo ser uma estratégia no desenvolvimento de vacinas anti-LVC (GIUNCHETTI *et al.*, 2008; FREITAS & PINHEIRO, 2010).

Em alguns casos de cães assintomáticos tem sido observado predominância de resposta imunológica mista tanto Th1 quanto Th2, com níveis aumentados de IL-2, INF- $\gamma$  e IL-10,

associada a redução de mRNA IL-4 no sangue periférico (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002; CHAMIZO *et al.*, 2005). Entretanto, a citocina IL-4 foi detectada em cães assintomáticos quando estimulados por antígeno leishmanial solúvel (CHAMIZO *et al.*, 2005). Para animais sintomáticos graves, a IL-4 se mostrou presente em altos níveis, especialmente em aspirados de medula óssea, sugerindo que essa citocina esteja associada aos mais severos sinais clínicos da doença (QUINNELL *et al.*, 2001).

A imunossupressão é uma consequência em parte da diminuição de células T CD4+, sendo observado muitos parasitos nos órgãos linfáticos, permitindo a multiplicação e dispersão do parasito para outros sítios, incluindo estômago, intestino e pulmão (SILVA, 2007). Os primeiros sinais clínicos da LVC no cão são febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia (LIMA *et al.*, 2004), seguido de caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, onicogrifose, alopecia generalizada, ulcerações por todo corpo, paresia de membros posteriores, ceratoconjuntivite e cegueira, levando a morbidade progressiva e morte do animal (LIMA *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2004; LANGONI *et al.*, 2005; LINHARES *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2009). Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal, sendo observada a presença de formas amastigotas de leishmanias (LINHARES *et al.*, 2005; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; PAPADOGIANNAKIS & KOUTINAS, 2015). A pele é um órgão importante na determinação da disseminação da doença por *Leishmania*, uma vez que é o sítio de infecção dos flebotomíneos (BRASIL, 2006; SILVA, 2007).

Algumas características da patogênese da LVC são decorrentes da quantidade dos anticorpos produzidos que formam imunocomplexos, os quais se depositam em diversos tecidos, gerando lesões inflamatórias e hiperplasia (SILVA, 2007). Nos rins, tanto o infiltrado de células T CD4+ quanto a deposição de imunocomplexos nos glomérulos podem provocar glomerulonefrite e nefrite intersticial, com consequente comprometimento da função renal (LOPEZ *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2000), sendo uma das principais causas da morte de cães infectados.

As oftalmopatias apresentam uma frequência entre 16% e 80%, e podem ser a primeira alteração aparente da doença (PEÑA *et al.*, 2000; SAUQUILLO, 2005). As principais alterações oculares são: alopecia periocular, blefarite, conjuntivite e uveíte anterior, enquanto a ceratoconjuntivite seca, catarata, coriorretinite, descolamento de retina e glaucoma são mais incomuns (PEÑA *et al.*, 2000; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; SAUQUILLO, 2005).



O comprometimento cardiovascular é raramente descrito e, na maioria das vezes, ocorrem em casos isolados (TORRENT *et al.*, 2005; LÓPEZ-PEÑA *et al.*, 2009). Quando presentes pode apresentar miocardite multifocal com inflamação rica em linfócitos, histiócitos e plasmócitos parasitados, podendo ser acompanhada por necrose e degeneração das fibras miocárdicas (FERRARI *et al.*, 2006).

Nos ossos e articulações, a LVC pode manifestar lesões osteolíticas e osteoproliferativas de diáfises ósseas em 45% dos casos, com alterações na marcha e sinais de atrofia muscular (BURRACO *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2005). Também foi relatado poliartrite, decorrente do depósito do parasita e de seus imunocomplexos na membrana sinovial (BANETH *et al.*, 2008; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). A presença de lesões ósseas e das almofadas plantares, polimiosite e neuralgia são causas adicionais. A atrofia muscular progressiva está associada à polimiosite crônica caracterizada pela presença de infiltrados de macrófagos parasitados, vasculite neutrofílica e depósitos de imunocomplexos nos tecidos musculares (BANETH *et al.*, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Alterações fisiológicas e de tamanho no baço e no fígado são bastante variáveis na LVC (FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; RALLIS *et al.*, 2005). Os exames histopatológicos descrevem presença de necrose multifocal, hiperplasia e infiltração por macrófagos parasitados (MOLANO *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2014). Além disso, a produção aumentada de proteínas associada ao quadro imunológico (altos níveis de imunoglobulinas) e proteinúria, levam a perda de peso e a atrofia da musculatura das fossas temporais, causando a caquexia e apatia dos animais (FERRER, 2002; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2004).

Lesões hipertróficas nas regiões corticais e medulares dos linfonodos são comuns, podendo conter grande quantidade de macrófagos medulares parasitados (LIMA *et al.*, 2004). A linfadenopatia é caracterizada pelo aumento do tamanho dos linfonodos, sendo os linfonodos pré-escapulares e poplíteos os mais afetados (KOUTINAS *et al.*, 1999). Na medula óssea, como em outros órgãos linfoides, também ocorrer hipertrofia e a hiperplasia das células (TAFURI *et al.*, 2001; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007). A hipoplasia e aplasia medular podem resultar em anemia e trombocitopenia associado ou não a quadros de hemorragias, geralmente na cavidade nasal (epistaxe) (FERRER, 1999). Além disso, a hemorragia como acometer outros órgãos, como fígado e baço, devido à hiperglobulinemia e interferência na formação da malha de fibrina, sequestro esplênico de plaquetas, vasculite por imunocomplexos e uremia (LUVIZOTTO, 2006).

O tratamento farmacológico da LVC é um desafio para os médicos veterinários, visto que todos os fármacos anti-*Leishmania* conhecidos, usados em cães e humanos, podem levar à remissão temporária ou permanente dos sinais clínicos, mas nenhum consegue eliminar a infecção, prevenir a ocorrência de recidivas e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (BRASIL, 2006; OLIVA et al., 2010; GREENE, 2015). Além disso, torna esses animais uma fonte de infecção e disseminação aos flebotomíneos (MEGID et al., 2018). Em países em que o tratamento é permitido, os principais medicamentos utilizados são os antimoniais pentavalentes, o alopurinol, a aminosidina, a anfotericina B e a miltefosina, podendo ser empregados de forma isolada ou em associação. O planejamento terapêutico é realizado conforme o quadro clínico e imunológico do animal, bem como sua resposta inicial para protocolo utilizado (OLIVIA et al., 2010; SOLANO-GALLEGU et al., 2011; CORTESE et al., 2015; LARSSON & LUCAS, 2016; REGUERA et al., 2016).

No Brasil, o tratamento dos animais com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA é proibido por meio da portaria interministerial nº 1.426 de 2008 do Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Sendo que, atualmente a droga mais utilizada para LVC é a miltefosina (Milteforan® Virbac), que teve seu registro autorizado em 2016 pela nota técnica conjunta nº001/2016 – MAPA/MS para o uso veterinário, visto que essa droga não é utilizada para o tratamento da doença humana (BRASIL, 2016a). A miltefosina tem como mecanismo inibir a síntese da membrana celular do parasito, interrompendo as vias de sinalização celulares, induzindo assim a morte desses parasitos por mecanismos de apoptose (RAKOTOMANGA et al., 2007; REGUERA et al., 2016). Entretanto, devido à falta de comprovações de cura parasitológica com uso de qualquer droga recomendadas pelo MAPA, o tratamento farmacológico desses animais infectados, ainda não é recomendada pelo MS, sendo seu uso, única e exclusivamente de escolha do proprietário do animal (BRASIL, 2016a).

## **2.5 Aspectos fenotípicos associados a incidência da LVC**

O fator de risco para LVC tem sido associado às diferenças fenotípicas e genéticas dos animais, especialmente quanto a raça, sexo e idade (SIDERIS et al., 1996; BARBOZA et al., 2009; SOLANO-GALLEGU et al., 2011). Porém, os estudos ainda são muito escassos e pouco consensuais (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Para certos autores o sexo não é relevante (ALENCAR & CUNHA, 1963; ABRANCHES et al., 1991a; CIARAMELLA et al., 1997; ZAFFARONI et al., 1999; CRINGOLI et al., 2002; LEONTIDES et al., 2002; CABRERA et al., 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2003), enquanto, em outros estudos tem apontado que os

machos têm maior propensão para a doença (LANOTTE *et al.*, 1975; JULIÃO *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 2008; FERNANDES, 2018).

Em relação à idade, parece haver uma relação de frequência da LVC quando associado ao desenvolvimento dos animais (ALENCAR & CUNHA, 1963; AZEVEDO & NEVES, 1963; LANOTTE *et al.*, 1975; POZIO *et al.*, 1981; SIDERIS *et al.*, 1996). Abranches *et al.* (1991a) observaram que a doença ocorria apenas em cães jovens ou idosos, não sendo observado em animais na fase adulta. Em concordância a isso, a maioria dos estudos se referem a picos de frequência da doença, sendo mais observado antes dos 2 anos ou após os 8 anos de idade (CARDOSO *et al.*, 2004; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Em contrapartida, para outros autores existe uma maior ocorrência da LVC na idade adulta, entre 4 e 8 anos de idade (ALMEIDA, *et al.*, 2009; BARBOZA *et al.*, 2009; FERNANDES, 2018).

Apesar de todas as raças de canídeos poderem contrair a LVC, algumas raças parecem ter uma maior susceptibilidade à infecção, tais como o Boxer, Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Rottweiler, Pastor Alemão, Doberman, Beagle e Mastim Napolitano (ABRANCHES *et al.*, 1991b; RANQUE *et al.*, 1997; SIDERIS *et al.*, 1999; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; BANETH *et al.*, 2008; CORTES *et al.*, 2012; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; FERNANDES, 2018). No estudo conduzido por Sideris *et al.* (1996) em Atenas, Grécia, foi demonstrado que os cães Collie eram a raça menos afetada pela LVC, enquanto o Doberman era a raça mais susceptível. Porém, em outros estudos foi observado que a variável raça parece não ter relação à sororreatividade da LVC (POZIO *et al.*, 1981; LEONTIDES *et al.*, 2002; MOREIRA-JR *et al.*, 2003).

Ainda em relação à raça, Solano-Gallego *et al.* (2000) mostraram que a raça Podengo ibicenco tem maior resistência ao parasita *Leishmania*, no qual a maioria dos animais doentes apresentavam resposta imune celular, sem desenvolvimento de sinais clínicos e ainda apresentavam cura espontânea. Essa maior resistência, foi relacionada aos fatores genéticos, onde o gene *Slc11c1* e alguns alelos dos genes do MHC II foram associados à maior resistência no desenvolvimento da LVC (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos relacionados ao fator tipo de pelo tem descrito que animais de pelo curto apresentam maior susceptibilidade à LVC (SIDERIS *et al.*, 1996; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; MOREIRA-JR *et al.*, 2003; JULIÃO *et al.*, 2007; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; BARATA *et al.*, 2013). Para esses autores, este fato foi associado ao impedimento espacial ao local da picada em animais que apresentam maior quantidade de pelos, além de outros fatores potenciais, como CO<sub>2</sub> e irradiação pelo calor também podem estar envolvidos

(MOREIRA-JR *et al.*, 2003). Poucos trabalhos apresentam resultados discordantes quanto à associação de soropositividade canina e comprimento de pelo dos cães (FISA *et al.*, 1999; LEONTIDES *et al.*, 2002).

Além desses fatores apontados, alguns trabalhos ainda levantam que outros fatores, tais como hábitos do animal, relação entre animais de trabalho ou domésticos, status imunológico, presença de galinheiros e chiqueiros no ambiente peridomiciliar podem estar associados à uma maior suscetibilidade (SIDERIS *et al.*, 1996; 1999; DYE *et al.*, 1991; ARIAS *et al.*, 1996; MOREIRA JR *et al.*, 2003; JULIÃO *et al.*, 2007; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Assim, estudos que avaliem esses fatores como predisponentes ou não a doença, se fazem necessários, a fim de se estabelecer medidas de controle mais eficientes.

## 2.6 Diagnóstico

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa, confiável e o mais precocemente possível (BRASIL, 2006). O diagnóstico é usado para confirmação da doença em animais tipicamente doentes (com sinais clínicos), investigar a presença/frequência da doença em estudos epidemiológicos, rastrear animais clinicamente saudáveis de regiões endêmicas, evitar a transmissão de portadores subclínicos por transfusão de sangue/venérea e monitorizar a eficácia do tratamento (MIRÓ *et al.*, 2008). Existe atualmente uma grande variedade de métodos para diagnóstico canino, porém nenhum permite o diagnóstico correto da LVC isoladamente (MAIA & CAMPINO, 2008), desta maneira, a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos se fazem necessários para um diagnóstico definitivo (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007; FREITAS *et al.*, 2012; MOHAPATRA *et al.*, 2014; DANTAS TORRES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo e difícil de ser realizado devido à variedade de sinais da doença, com ausência de sinais patognomônicos, além de muito serem comuns a outras enfermidades infectocontagiosas (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007), outro problema é a alta suscetibilidade a infecções oportunistas (coinfecções com *Ehrlichia canis*, *Babesia* sp., *Dirofilaria immitis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*) dos animais com LVC (SILVA, 2007; GOMES *et al.*, 2008), dificultando ainda mais o diagnóstico clínico além de tornar os diagnósticos diferenciais mais complicados e diversos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sinais após períodos que variam de três meses a alguns anos (BRASIL, 2006; MIRÓ *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2010), variando largamente devido aos mecanismos patogênicos no processo de doença, dos diferentes órgãos afetados e da diversidade da resposta imunológica (SOLANO-GALLEGUE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2019). Os sinais mais comuns (Figura 5) são alterações cutâneas (descamação excessiva da pele, dermatite esfoliativa, ulcerativa, nodular e pústular), linfadenomegalia local ou generalizada, caquexia, hepatoesplenomegalia, onicogribose, epistaxes, doenças oculares (uveíte anterior, conjuntivite, queratoconjuntivite seca, blefarite) e apatia (BANETH *et al.*, 2008; MAIA & CAMPINO, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014).

**Figura 5** – Sinais clínicos comuns em animais com Leishmaniose Visceral Canina.



A – Lesões mucocutâneas nasais ulcerativas; B – Uveíte bilateral e opacidade da córnea; C – Dermatite papular ulcerativa; D – Alopecia periocular esfoliativa e blefarite; E – Dermatite esfoliativa; F – Epistaxe; G – Caquexia; H – Onicogribose. Foto adaptada de SOLANO-GALLEGUE *et al.*, 2011.

O diagnóstico, tanto humano quanto os inquéritos caninos, eram realizados somente por meio dos exames diretos ou parasitológicos, como a punção de fígado, de baço, de linfonodos, de medula óssea e o raspado de pele, até meados da década de 30. Esses exames são altamente seguros quanto à positividade dos casos, mas não são eficazes a fim de se realizar cobertura total dos animais positivos, devido ao procedimento invasivo, necessidade de profissional

altamente capacitado e restrições em alguns procedimentos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006; FARIA & ANDRADE, 2012). A especificidade destes métodos é alta (virtualmente de 100%), mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea nos diferentes tecidos (FARIA & ANDRADE, 2012).

O exame direto consiste no encontro das formas amastigotas na amostra obtida, podendo ser por meio de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, imunohistoquímica, citologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (GONTIJO & MELO, 2004), sendo estes dois últimos usados mais em pesquisas científicas, pois são bastante laboriosos e demorados (MAIA & CAMPINO, 2008; PALTRINIERI *et al.*, 2016). E apesar da alta especificidade, em muitos casos, especialmente, em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes, podem ocorrer resultados falso negativos. A maior sensibilidade alcançada neste tipo de diagnóstico é quando se utiliza aspirado do baço (98%) e punção aspirativa esplênica (95%) (GONTIJO & MELO, 2004). Quando associado a métodos de cultivo e/ou inoculação em animais pode-se aumentar a sensibilidade do diagnóstico, porém há um retardo no resultado em semanas a meses (GUERIN *et al.*, 2002). Mas para evitar resultados errôneos, faz-se necessário o teste por PCR antes do diagnóstico negativo final, podendo ser realizada em sangue, fluidos corporais ou amostras histopatológicas (PALTRINIERI *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2011).

O diagnóstico sorológico baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes (IgG), produzidos durante a resposta imune humoral a doença (GONTIJO & MELO, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). O intervalo de soroconversão pode variar de 1 a 22 meses após a infecção, com uma média de 5 meses, sendo que os títulos permanecem elevados por pelo menos dois anos (PALTRINIERI *et al.*, 2016). As falhas destes testes podem estar relacionadas ao período de sua realização como por exemplo, em cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão ocorre resultados falso-negativos ou devido a reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, além de doenças como a erliquiose, rickettsiose, toxoplasmose, neosporose e outras, que geram resultados falso-positivos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; GOMES *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Os testes sorológicos diferem quanto a sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes (GONTIJO & MELO, 2004), sendo os testes mais comuns a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a imunocromatografia (testes rápidos).

A RIFI foi inserida a partir da década de 60, apresenta uma sensibilidade que varia de 90 a 100% e uma especificidade aproximada de 80%, para títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1:160 (PROVERBIO *et al.*, 2013). Porém, para o MS é considerado resultado reagente títulos igual ou superior a 1:40, com repetição do teste em 30 dias para sua confirmação (BRASIL, 2006). Apesar da alta sensibilidade, o teste apresenta baixa especificidade, visto que sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e equipamento especializado de alto custo. As diluições seriadas do soro tornam o teste laborioso e inviável para triagem de grande número de amostras (FARIA & ANDRADE, 2012). Além disso, a principal limitação e consequente redução da especificidade do teste é a ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, tais como leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (GONTIJO & MELO, 2004; SOUZA *et al.*, 2013).

O ELISA foi desenvolvido na década de 1970 (ENGVALL & PERLMANN, 1971), permitindo aplicação em muitas amostras concomitantemente, com resultados mais rápidos. Além disso, pode ser adaptada para o uso com diversos antígenos, como antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes (MAIA & CAMPINO, 2008; MIRÓ *et al.*, 2008). O uso de antígenos brutos é sensível para a detecção de infecção subclínica ou clínica, mas apresenta uma especificidade relativamente baixa (METTLER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007). Porém, o uso de peptídeos recombinantes, como as proteínas K9, K26 e K39, a técnica de ELISA se tornou altamente específica (100%) e sensível (98%), mesmo para detecção de cães infectados clinicamente saudáveis (ALVES & BEVILACQUA, 2004; METTLER *et al.*, 2005). Atualmente, o diagnóstico confirmatório da doença é realizado via detecção por esta técnica (BRASIL, 2006).

A introdução de técnicas cromatográficas no diagnóstico da LVC surgiu na década de 1990, com o desenvolvimento da imunocromatografia também conhecido como testes rápidos (TR) (FARIA & ANDRADE, 2012). Essa técnica possui vários pontos positivos, como a rapidez do resultado (cerca de 30 minutos), facilidade de uso em campo, boa sensibilidade (77 a 100%) e especificidade (75 a 100%) (GRADONI, 2002; COSTA *et al.*, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; BISETTO JUNIOR *et al.*, 2015). No entanto, segundo alguns autores, os resultados podem ser questionáveis, visto a baixa sensibilidade do teste (inferior a 60%) na maioria dos casos (METTLER *et al.*, 2005; FERROGLIO *et al.*, 2007; MAIA & CAMPINO, 2008; SILVA *et al.*, 2016). Isso porque a sensibilidade do teste depende da situação clínica do animal, sendo observada baixa sensibilidade em cães assintomáticos (12 a 47%) (BISETTO JUNIOR *et al.*, 2015). Por isso, o TR tem sido aplicado como um teste de triagem em campo,

devido a sua alta aplicabilidade, mas outros testes sorológicos devem ser usados como confirmatório para LVC (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; PALTRINIERI *et al.*, 2016).

Até meados de 2011, as técnicas sorológicas recomendadas para o inquérito canino eram o ELISA como teste de triagem e a RIFI como teste confirmatório (BRASIL, 2006). Atualmente o diagnóstico da LVC recomendado pelo Ministério da Saúde, segundo a nota técnica conjunta n. 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, é o teste imunocromatográfico denominado teste rápido de dupla migração produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (TR DPP® Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), como exame de triagem, e o teste ELISA recombinante (EIE® Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) como exame confirmatório. O teste TR DPP® é um teste inovador composto pela mistura dos peptídeos recombinantes K26 e K39 de *L. infantum chagasi*, que permitiu ao TR DPP® uma melhor sensibilidade (93 a 100%) e especificidade (92 a 100%) (GRIMALDI *et al.*, 2012). Além disso, pode ser realizado o exame parasitológico (padrão ouro) para um diagnóstico correto e completo da LVC (BENITES *et al.*, 2011; BISETTO JUNIOR *et al.*, 2015).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, aspirados de linfonodos, baço e fígado, biópsias cutâneas, conjuntiva, sangue, líquido, cortes histológicos de tecidos parafinados e congelados (ALVAR *et al.*, 2004; GONTIJO & MELO, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). A sensibilidade depende do tecido utilizado na análise, como, por exemplo, amostras de sangue, apesar da coleta menos invasiva a sensibilidade é muito baixa devido às flutuações na parasitemia. Por outro lado, em tecidos linfóides ocorre um aumento da sensibilidade (LACHAUD *et al.*, 2002; MANNA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2007; FARIA & ANDRADE, 2012; BRITO & PEREIRA, 2014). Essa técnica permite a identificação da espécie do parasito, sendo muito usada em pesquisas científicas (OLIVEIRA, 2015). A técnica de PCR em tempo real, ainda trouxe outras vantagens em comparação a PCR convencional, como o monitoramento contínuo da amplificação do DNA, permitindo a quantificação da carga parasitária altamente sensível, em diferentes amostras, podendo ser usada para monitoramento, especialmente em áreas endêmicas (FRANCINO *et al.*, 2006; MAIA & CAMPINO, 2008; GALLETTI *et al.*, 2011).

As técnicas sorológicas não permitem a distinção da resposta imune IgG-mediada induzida pela doença natural ou quando induzida pela vacinação (SCHIMMING & PINTO E SILVA, 2012; FARIA & ANDRADE, 2012). Isso porque a soropositivação significa que o



animal apresenta os anticorpos específicos, mas não necessariamente o agente infeccioso. Assim, é extremamente importante garantir que o animal antes da vacinação esteja negativado, por meio das diferentes técnicas de diagnóstico, especialmente a PCR de aspirado de linfonodo, baço e medula óssea (BARRETTO, 2006).

## 2.7 Histórico e Epidemiologia

A LV tem ampla distribuição geográfica com relatos em todos os continentes, e de ocorrência endêmica na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas, acometendo cerca de 98 países no mundo (BANETH *et al.*, 2008; DEN BOER *et al.*, 2011; MEGID *et al.*, 2018). O primeiro caso relatado de LV ocorreu em 1885, na Índia, mas somente em 1903 foi descoberto o agente causador desta doença por William Boog Leishman e Charles Donovan. Porém, ambos pesquisadores descreveram o parasito como pertencente as formas de *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903). Nesse mesmo ano, Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e nomeou o agente causador da LV de *Leishmania donovani*, em homenagem aos pesquisadores descobridores Leishman W. e Donovan C. (ROSS, 1903).

Em 1908, Nicolle e Comte sugeriram que os canídeos participavam da disseminação da doença, onde alguns animais apresentavam a presença do parasito e alguns sinais clínicos do calazar na Tunísia (NICOLLE & COMTE, 1908), enquanto a descoberta da participação dos flebotomíneos como vetor da doença, somente foi realizada em 1931, após observação de que a distribuição da doença era coincidente com a distribuição do vetor *Phlebotomus argentipes*, na região do Velho Mundo (ADLER & THEODOR, 1931). Atualmente, 90% dos casos estão restritos a região do Mediterrâneo, com destaque à Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e o Brasil (SILVA, 2007; BANETH *et al.*, 2008), fora alguns surtos esporádicos relatados na Europa, como no norte da Itália (DANTAS TORRES *et al.*, 2012). Segundo Greene (2015), todo ano mais de dois milhões de casos novos de leishmaniose são registrados no mundo, com cerca de 50 mil mortes (WHO, 2013).

No Brasil, o primeiro registro de caso humano da LV, ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (MIGONE, 1913). Em um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil em 1934, Penna encontrou pela primeira vez o parasito *Leishmania* sp., em lâminas histológicas de fígado de 41 casos pacientes da região norte e nordeste (PENNA, 1934; GONTIJO & MELO, 2004). Nos anos 30, Evandro Chagas descreveu as primeiras observações da doença canina por *Leishmania* sp., descrevendo a doença tanto no homem

quanto em seu cão, e classificou o agente como *Leishmania chagasi*. Este mesmo pesquisador foi também o primeiro a correlacionar a doença com o vetor do Novo Mundo, o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (CHAGAS, 1936; CHAGAS *et al.*, 1938; BISETTO-JUNIOR *et al.*, 2015).

No Brasil, o cão e a raposa foram apontados como reservatórios naturais nas áreas de maior expressão da endemia, em 1956 por Deane, que definiu a doença como uma zoonose (DEANE, 1956), observando que normalmente a LVC antecede a doença humana (SILVA, 2007). Em 1958, outros animais silvestres foram encontrados naturalmente infectados com a *Leishmania*, em florestas do sul do Brasil (DEANE & DEANE, 1962), iniciando as primeiras campanhas governamentais nas áreas endêmicas, por meio de técnicas de controle e conscientização da LV (BISETTO-JUNIOR *et al.*, 2015).

A notificação obrigatória da LV começou em 1978, onde 70% dos estados brasileiros registraram casos autóctones do calazar. Sendo que, a região Nordeste representou o principal foco da doença, com 90% dos casos, especialmente nos estados da Bahia, Piauí, Ceará e Maranhão, (FUNASA, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1994), nos anos 80. O primeiro surto urbano relatado ocorreu em Teresina, Piauí, resultando em 900 casos de LV no período de 1981 a 1985 (COSTA & PEREIRA, 1990). No início dos anos 90, a doença se espalhou por todo o país, com casos autóctones relatados em 25% dos municípios brasileiros em 21 estados. A partir deste período, houve uma mudança nos padrões epidemiológicos da LV, cuja doença, considerada como um problema exclusivamente silvestre ou restrito às áreas rurais, avançou para outras regiões alcançando a periferia de grandes centros urbanos (COSTA *et al.*, 1990; NASCIMENTO *et al.* 1996; SILVA *et al.*, 2001; GONTIJO & MELO, 2004; BRASIL, 2006; ZORZETTO, 2008), especialmente, nas regiões sudeste e centro-oeste (BRASIL, 2006; SILVA, 2007; NERY *et al.*, 2017).

A região Sul considerada por muito tempo, como a única região do país livre da doença, teve o primeiro registro de LVC em 2008, na cidade de São Borja, no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2016b). No ano seguinte, ocorreram os primeiros casos humanos, na mesma cidade (BRASIL, 2010; 2016b). Em Santa Catarina, até o momento foi registrado somente casos de LVC, ocorrendo o primeiro relato em 2012, na cidade de Florianópolis (FIGUEIREDO *et al.*, 2012). Já no estado do Paraná, a LVC foi registrada em 2013 e o primeiro caso de LV humano foi confirmado em julho de 2015 (BISETTO JUNIOR *et al.*, 2015).

Em quase 30 anos, o número médio de casos relatados por ano aumentou de 1.601 (1985-1989) para 3.816 (2008-2012), com uma incidência de 1,9 caso/100.000 habitantes, no

período de 2003 a 2012 (WERNECK, 2014; BRASIL, 2016b). No mesmo período, a letalidade para os casos humanos apresentou uma média de 6,9% a 10% (BARBOSA, 2013; BRASIL, 2016b). Os dados atuais disponíveis mostram claramente que a LV é uma doença das áreas urbanas e que não há sinais perceptíveis de que sua disseminação esteja sob controle (WERNECK, 2014).

Foi apontado que as modificações ambientais provocadas pelo homem, o desmatamento, as queimadas, o crescimento desordenado das cidades, a migração de pessoas para a periferia de centros urbanos, a presença constante de animais domésticos e de vetores, aliados aos problemas de saneamento básico, moradia e desnutrição são fatores determinantes para esse processo de urbanização e expansão geográfica da LV no Brasil (BARATA *et al.*, 2005; BRASIL 2006; MARCONDES & ROSSI, 2013). Além disso, o desconhecimento em relação aos fatores de risco associados à doença, a falta de manejo ambiental e higiene peridomiciliar, o nível de conhecimento e a falta de recursos dos proprietários dos animais tem contribuído em grande parte, para a manutenção da doença nas regiões carentes (COURA-VITAL *et al.*, 2011; SCANDAR *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2012; SANTANA-FILHO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2013).

No Brasil, a LV é uma das principais doenças negligenciadas presentes e prevalentes em regiões mais carentes e desfavorecidas. Este aspecto contribui em grande parte para a manutenção do quadro de desigualdade que temos hoje, pois representa uma forte barreira para o desenvolvimento social e econômico do país (BRASIL, 2006; 2016). Com destaque ao impacto que a LV produz na saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômico-sociais que ocorrem pela depleção da força de trabalho (CARVALHO NETA *et al.*, 2007; BORASCHI & NUNES, 2007).

Estudos epidemiológicos em áreas urbanas têm verificado sobreposição entre locais com incidência de casos humanos e elevada soropositivação canina, evidenciando a estreita relação entre a doença canina e a humana (VIEIRA & COELHO, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2018). Uma vez que, os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos, isso porque, nos cães ocorre um maior parasitismo dérmico do que o homem, o que favorece a aquisição do parasita pelos vetores. Nesse contexto, cães soropositivos sintomáticos ou assintomáticos desempenham um papel importante na manutenção do ciclo da doença no meio urbano (FEITOSA *et al.*, 2000; MICHALSKY *et al.*, 2007; STEINDEL *et al.*, 2013).

Por isso, medidas de controle voltadas ao meio ambiente e ao peridomicílio com o objetivo de diminuir a densidade populacional de vetores, eliminação de criadouros peri e intradomiciliares e, especialmente a remoção das possíveis fontes de alimento, como os canídeos infectados (inquérito sorológico canino) por meio da eutanásia são as principais medidas do controle da doença adotadas pelo governo até hoje (BRASIL, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; ROMERO & BOELAERT, 2010; BRASIL, 2016b; MEGID *et al.*, 2018). No entanto, estudos têm avaliado alternativas à eutanásia dos animais, como o tratamento de cães infectados, a vacinação e o uso de coleiras impregnadas com deltametrina (NERY *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2018; KAZIMOTO *et al.*, 2018; TOEPP *et al.*, 2018). Dentre estas estratégias, a última tem apresentado resultados promissores quanto à sua utilização como medida de saúde pública (MAROLI *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2018; KAZIMOTO *et al.*, 2018; WERNECK *et al.*, 2018).

Atualmente, o Brasil é responsável por 90% dos casos de LV nas Américas (BRASIL, 2006; 2016; SILVA, 2007; BONNEY, 2016), com ampla distribuição no território, abrangendo as cinco regiões e presente em 26 das 27 unidades da federação (BRASIL, 2017). Nos últimos anos, foram notificados casos, especialmente, nas regiões da Bahia (BARBOZA *et al.*, 2007), Ceará (CAVALCANTE & VALE, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017), Mato Grosso (ALMEIDA *et al.*, 2010), Mato Grosso do Sul (MARQUES *et al.*, 2017), Paraíba (SILVA *et al.*, 2017b), Pernambuco (QUEIROZ *et al.*, 2004), Rio Grande do Norte (XIMENES *et al.*, 2007; BARBOSA, 2013; LEITE & ARAÚJO, 2013), Rio Grande do Sul (SOUZA *et al.*, 2014), São Paulo (ORTIZ & ANVERSA, 2015) e Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2010; GUSMÃO *et al.*, 2014).

Em Minas Gerais, o município de Diamantina, região norte do estado, é considerado região endêmica para leishmaniose visceral, com notificações diárias de casos positivos para LVC, bem como vários registros de casos da doença humana, inclusive alguns destes resultando em óbito. Por isso, nessa região há necessidade e urgência de trabalhos a fim de conhecer, identificar e executar ações para o controle e prevenção da LVC no município, buscando assim a prevenção, promoção e preservação da saúde da população. Este estudo tem por objetivo reunir informações essenciais aos profissionais da saúde, educação, gestores, população e outros setores da sociedade civil, além de realizar um inquérito diagnóstico canino nas zonas rurais e urbanas do município e conhecer e quantificar os dados relativos ao papel do cão e de suas características fenotípicas na LVC, para subsidiar possíveis intervenções preventivas locais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Conhecer e determinar os aspectos epidemiológicos com relação à importância do cão doméstico (*Canis familiaris*) envolvidos na transmissão do parasito no município de Diamantina, Minas Gerais, a fim de direcionar ações de controle e prevenção.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar a frequência da LVC na área rural e urbana do município de Diamantina através de métodos sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde (DPP® e ELISA).
- II. Associar a presença de sorologia positiva com a procedência, sexo, raça e tipo de pelo dos cães.
- III. Construir um mapa georreferenciado com a localização dos casos positivos de LVC.
- IV. Caracterizar a espécie de *Leishmania* circulante em cães suspeitos por PCR.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Área de estudo

O município de Diamantina (18° 14' 17" Sul; 43° 36' 40" Oeste) está localizado na região do Espinhaço Meridional norte de Minas Gerais, pertencente a mesorregião do Vale Jequitinhonha, na região sudeste do Brasil. Diamantina é uma cidade urbanizada de pequeno porte, mas caracteriza-se por ser polo da região para serviços de saúde e educação, com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,716 (IBGE, 2010). A cidade possui 47.723 habitantes, em 3.891,65 km<sup>2</sup> de território e densidade populacional de 12,3 hab./km<sup>2</sup> (IBGE, 2019). Os bairros que compõem o município apresentam características de área rural, com grande concentração de pobreza e dificuldade de acesso aos serviços de saúde (ANDRADE & SZWARCOWALD, 2007; VICTORA *et al.*, 2011), habitações modestas e em condições sanitárias inadequadas, onde muitos praticam agricultura de subsistência e criação de animais domésticos. A população canina estimada para o município é em torno de 5 mil cães.

A região apresenta clima subtropical úmido, no qual as temperaturas variam ao longo do ano, com temperatura média anual de 18°C, e presença de chuvas de verão (verões frescos) e invernos mais frescos e secos (CUPOLILLO, 2008; GIANOTTI, 2012). A umidade relativa do ar é quase sempre elevada, com médias anuais de 75,6%. A vegetação predominante da região são formações de cerrado, do tipo Campo Rupestre e Cerrado Rupestre (GIANOTTI, 2012), com predominância de solos rochosos e arenosos (ABREU *et al.*, 2005).

### 4.2 Aspectos éticos

Este estudo foi conduzido em conjunto ao Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do município de Diamantina, respeitando os aspectos éticos de estudos com animais. Para os animais considerados sororreativos, foi realizada nova visita para apresentação do resultado e realização da eutanásia de acordo com a Resolução nº 1.000, 11 de maio de 2012, pelo Médico Veterinário da equipe de campo, caso o proprietário consentisse.

### 4.3 Análise do perfil fenotípico dos cães

Foram realizadas visitas domiciliares pela equipe de campo, através de solicitação de seus proprietários em residências que tinham cães, tanto da área urbana quanto da área rural do município de Diamantina (Figura 6). A equipe de campo contou com a participação de um Médico Veterinário e de pessoal treinado pertencente à equipe de agentes de endemias do município.

**Figura 6** – Visitas domiciliares e o Trabalho de campo no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.



A – Conversa sobre a pesquisa com a moradora, conscientização e educação em saúde sobre a LVC; B – Coleta sanguínea da ponta da orelha do animal; C – Realização do teste rápido (DPP®) no local de coleta. Fonte: Próprio autor.

Para cada cão examinado foi preenchido uma ficha epidemiológica impressa (Figura 7) contendo as informações básicas da coleta e do proprietário do cão, tais como data da coleta, endereço completo do imóvel, nome do proprietário e número da amostra. Além disso, foram coletadas informações referentes ao animal, tais como nome do animal, sexo, raça, tipo de pelo (longo ou curto), presença ou ausência de sinais clínicos evidentes para LVC. A classificação clínica dos animais em sintomáticos e assintomáticos e descrição dos sinais clínicos em: lesões cutâneas, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia local ou generalizada, conjuntivite, apatia, epistaxe, diarreia, anorexia, desidratação grave, edema de patas, hiperqueratose e outras foi realizada segundo Mancianti *et al.* (1988), com modificações. O período de coleta dessas informações e realização dos testes sorológicos compreendeu o ano de 2019.

**Figura 7** – Formulário impresso para coleta de dados dos animais e de seus proprietários, no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE CÃES SUSPEITOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

Data: 02 / 07 / 2019

Proprietário: GABRIEL AMARAL SILVA

Endereço: RUA DO ARAÚJO, 108, S/Nº

Bairro: SEARA DO TROVÃO

DADOS DO ANIMAL:

Nome do cão: PULVERA M ☐ F ☒ Idade: 9 MESES Raça: SRD

Natural de: SEM RAÇA DEFINIDA

Resultado: Positivo + teste Giemsa (negativo)  
GPP = 510.000/mm³

SINTOMAS:

Assintomático (☒) Apatia (-) Emagrecimento (-) Alopecia (-) Lesões cutâneas (-)

Lesões de face (-) Lesões de orelha (-) Ceratoconjuntivite (-) Onicogribose (-)

Paresia dos membros posteriores (-) Ectoparasitos (-)

Outros: -

Início provável dos sintomas: -

Viagens ou passeios: SIM

Responsável pela investigação: WAGNER GEORGE DA PAIXÃO  
ERIVANE DOS SANTOS  
SAMUEL EXPEDITO  
NÍCO DO RÊA

Fonte: Próprio autor.

A classificação das raças foi baseada no American Kennel Club (Estados Unidos), que reconhece cerca de 147 raças de cães. Para aqueles animais decorrentes de cruzamentos aleatórios e/ou desconhecidos, que não seguiram os padrões estabelecidos pela norma usada, foram classificados como animais Sem Raça Definida ou SRD.



#### 4.4 Construção do mapa geo-espacial para identificação das áreas de risco

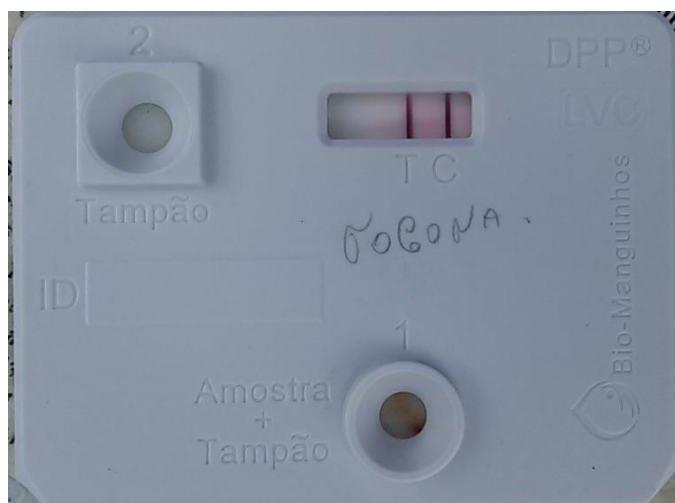
A partir dos dados coletados nas fichas de realização do teste rápido (TR DPP® Biomanguinhos/FIOCRUZ) realizado pelo serviço da vigilância ambiental do município de Diamantina-MG, onde consta os endereços de todos os locais em que se encontrou animal sororreativo para LVC, foi construído um mapa geoespacial, por meio do recursos gratuito no *Google My Maps*, disponível em [www.google.com/maps/d/](http://www.google.com/maps/d/).

#### 4.5 Realização do diagnóstico sorológico

O inquérito canino foi realizado segundo o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (2011), pela Nota Técnica Conjunta Nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Para isso, foi primeiramente realizado o teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina da Bio-Manguinhos/FIOCRUZ fornecidos pela Secretária Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), de todos os cães visitados e examinados. O teste DPP® foi realizado em amostras de sangue total (gota), da ponta da orelha do animal obtido por meio de lanceta estéril, e adicionado na plataforma de teste junto à solução reagente, onde após 15 minutos era obtido o resultado do exame.

Para todos os animais reagentes ao teste rápido de triagem (Figura 8), foi realizado a coleta de uma amostra de sangue, procedimento realizado pelo Médico Veterinário com auxílio da equipe de agentes de endemias municipais. A coleta foi realizada por punção na veia radial ou jugular, de 3,0 mL, armazenado em tubos sem anticoagulante previamente identificados e transportado sob refrigeração (2 a 8°C) até o laboratório municipal do Centro Regional de Zoonoses de Diamantina. Neste laboratório, as amostras sanguíneas foram processadas por centrifugação para obtenção do soro e, posteriormente, transportadas sob refrigeração (2 a 8°C) para Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais (FUNED-MG) para diagnóstico confirmatório através do exame *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, EIE® - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ).

**Figura 8** – Teste rápido DPP® com reação positiva, realizada em animal no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.6 Identificação da espécie de *Leishmania* circulante por PCR

Dez cães que apresentavam sinais característicos da LVC foram selecionados aleatoriamente para diagnóstico e identificação da espécie circulante de *Leishmania* sp. por meio da técnica de PCR. Amostras de sangue total foram novamente coletadas por punção na veia radial ou jugular, armazenadas em tubos sem anticoagulante previamente identificados, e enviados sob refrigeração (em gelo) ao Instituto de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). A extração e identificação da espécie de *Leishmania circulante* foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Michalsky *et al.* (2007).

#### 4.7 Análises Estatísticas

Para tabulação dos dados obtidos no levantamento epidemiológico e nos resultados dos testes sorológicos foi utilizado o *software LibreOffice*, versão 6.4.3.2, no armazenamento dos dados e na codificação das variáveis. Para cálculo da frequência com relação as diferentes variáveis analisadas foram aplicadas a equação 1. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software R*, versão 4.0.0. A análise bivariada entre as variáveis independentes: sexo (fêmea, macho), raça (RD, SRD), tipo de pelo (curto, longo), zona residencial (rural, urbana) com o desfecho de LVC foi realizada pelo teste qui-quadrado de *Pearson*, com correção de *Yates*. Todas as variáveis independentes cujo valor-*p* na análise bivariada foi menor que 0.20, foram

incluídas no modelo multivariado, no qual foi usado a Regressão de *Poisson* com variância robusta, para determinar a associação com o desfecho, medida pela Razão de Frequência (RF). A significância dos resultados está representada pelo valor-*p*, sendo que a associação foi considerada estatisticamente significativa se o valor-*p*, no modelo multivariado, for menor que 0,05.

### **Equação 1**

$$\text{Frequência (\%): [p.e variável Sexo]} \frac{n^{\circ} \text{ fêmeas com LVC}}{n^{\circ} \text{ total de fêmeas}} \times 100$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ machos com LVC}}{n^{\circ} \text{ total de machos}} \times 100$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo permitiram a avaliação epidemiológica da LVC por meio do inquérito sorológico junto ao PVCLV em 534 animais da região do município de Diamantina, MG. A distribuição da frequência de LVC da área rural e da área urbana do município de Diamantina no ano de 2019 estão apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Dos 534 animais examinados (152 da área urbana e 382 da área rural), 121 mostraram-se sororreativos (37 da área urbana e 84 da área rural), com uma frequência média de 22,6%. Nota-se que houve uma maior frequência de cães positivos na área urbana (24,3%) quando comparada à área rural (21,9%).

Entre os anos de 2016 a 2018, em um estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa neste mesmo município, foi possível observar uma maior frequência da LVC (29,9%) na área rural, e neste caso, este dado esteve associado à alta densidade de *L. longipalpis* (Anexo A). Resultado semelhante foi observado num estudo realizada na região metropolitana de Belo Horizonte, onde também foi verificado uma alta densidade da espécie *L. longipalpis* (68,2%) no peridomicílio, uma das espécies endêmicas no Brasil e responsável vetorial da LV (SOUZA *et al.*, 2004). Em outra região de Minas Gerais, na cidade de Janaúba, também foi verificado uma alta densidade desta espécie vetorial, que ao contrário do encontrado por Souza *et al.* (2004), foi relatado a presença da infecção natural do flebótomo ao parasita *L. chagasi*, conferindo participação desta espécie no ciclo epidemiológico da LV, na região (MICHALSKY *et al.*, 2011).

No período em estudo (2016-2018), já havia um direcionamento ao processo de urbanização da LVC, visto que a frequência para área urbana foi de 29,4%, próxima à observada para área rural. Esse perfil de mudança na epidemiologia da LVC no município de Diamantina está sendo direcionado para uma possível urbanização, a partir dos dados de 2019 apresentados neste estudo, onde pôde-se constatar uma maior frequência da LVC na área urbana em comparação a área rural.

**Tabela 1** - Distribuição da frequência de Leishmaniose Visceral Canina na área urbana do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

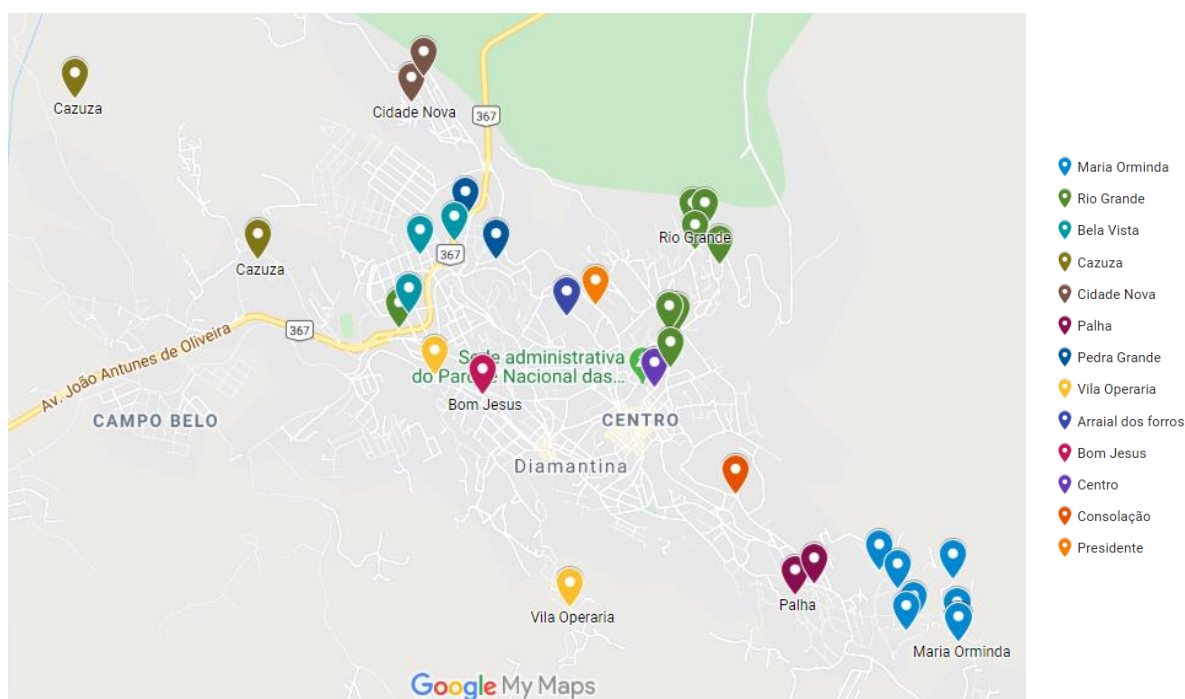
<b>Distritos</b>	<b>Número de animais examinados (N)</b>	<b>Animais sororreagentes (N)</b>	<b>Frequência (%)</b>
Arraial dos Forros	3	1	33,3
Bela Vista	6	3	50
Bom Jesus	4	1	25
Cazuza	5	2	40
Centro	7	1	14,3
Cidade Nova	10	2	20
Consolação	7	1	14,3
Maria Orminda	32	11	34,4
Palha	8	2	25
Pedra Grande	8	2	25
Presidente	1	1	100
Rio Grande	32	8	25
Vila Operária	11	2	18,2
Outros	18	0	0
<b>Total</b>	<b>152</b>	<b>37</b>	<b>24,3</b>

**Tabela 2** - Distribuição da frequência de Leishmaniose Visceral Canina na área rural do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

<b>Distritos</b>	<b>Animais examinados (N)</b>	<b>Animais sororeagentes (N)</b>	<b>Frequência (%)</b>
Aroeira	16	9	56,3
Bandeirinha	4	2	50
Barra de Pedraria	3	1	33,3
Barra do Matão	4	2	50
Bica D'água	8	1	12,5
Boa Vista	25	4	16
Brasão	10	2	20
Braúna	28	2	7,1
Buracão	3	2	66,7
Camu-Camu	22	2	9,1
Canjica de Cima	10	4	40
Capão dos Negros	7	1	14,3
Capão Maravilha	6	1	16,7
Capoeirão	16	2	12,5
Carambola	8	2	25
Córrego dos Caldeirões	7	2	28,6
Córrego Cipriano	2	1	50
Dacamão SJC	7	3	42,9
Faz. Calumbis	3	1	33,3
Faz. Novo Horizonte	5	1	20
Faz. Palhada	3	1	33,3
Formação	4	3	75
Jambreiro	5	3	60
Lagoa da Pedra	2	2	100
Mulatinho	6	2	33,3
Natureza	6	2	33,3
Perpétua	12	2	16,7
Ponte Queimada	4	1	25
Rapadura	2	2	100
Riacho da Porta	20	8	40
Ribeirão do Inferno	3	2	66,7
Ribeirão São Domingos	12	2	16,7
Santa Cruz	4	1	25
Santo Antônio	2	1	50
Tamburil	8	2	25
Tombador	2	1	50
Visitador	4	2	50
Vitoriano	3	2	66,7
Outros	88	0	0
<b>Total</b>	<b>382</b>	<b>84</b>	<b>21,9</b>

O perfil de distribuição por bairro dos animais sororreativos na área urbana está apresentado na figura 9. Os dados mostraram que dos 20 bairros avaliados, 13 deles (65%) apresentaram pelo menos um animal infectado, com maior número de casos caninos nos bairros Maria Orminda (11 animais) e Rio Grande (8 animais). Este perfil foi semelhante ao observado no estudo anterior, em que o bairro Maria Orminda também apresentou maior número de casos (Anexo A). Já para a área rural, das 60 comunidades visitadas, 38 delas (63,3%) apresentaram pelo menos um caso de LVC, sendo que as comunidades de Aroeira (9 animais), Riacho da porta (8 animais), Boa Vista (4 animais) e Canjica de Cima (4 animais) foram as localidades com o maior número de animais infectados. Dos animais diagnosticados com LVC, nove animais já haviam morrido e cento e seis (106) foram submetidos à eutanásia pelo médico veterinário responsável, conforme protocolo do MS. Somente seis animais tiveram recusa de eutanásia por parte de seus proprietários, que se responsabilizaram pelo procedimento.

**Figura 9** - Localização geográfica dos casos de Leishmaniose Visceral Canina da área urbana da cidade de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) com identificação dos bairros acometidos no ano de 2019.



Fonte: [www.google.com/maps/d/](http://www.google.com/maps/d/).

No período de 2007 a 2012, a frequência da LVC para a cidade de Diamantina era de 8,23%, segundo dados obtidos na Superintendência Regional de Saúde de Diamantina

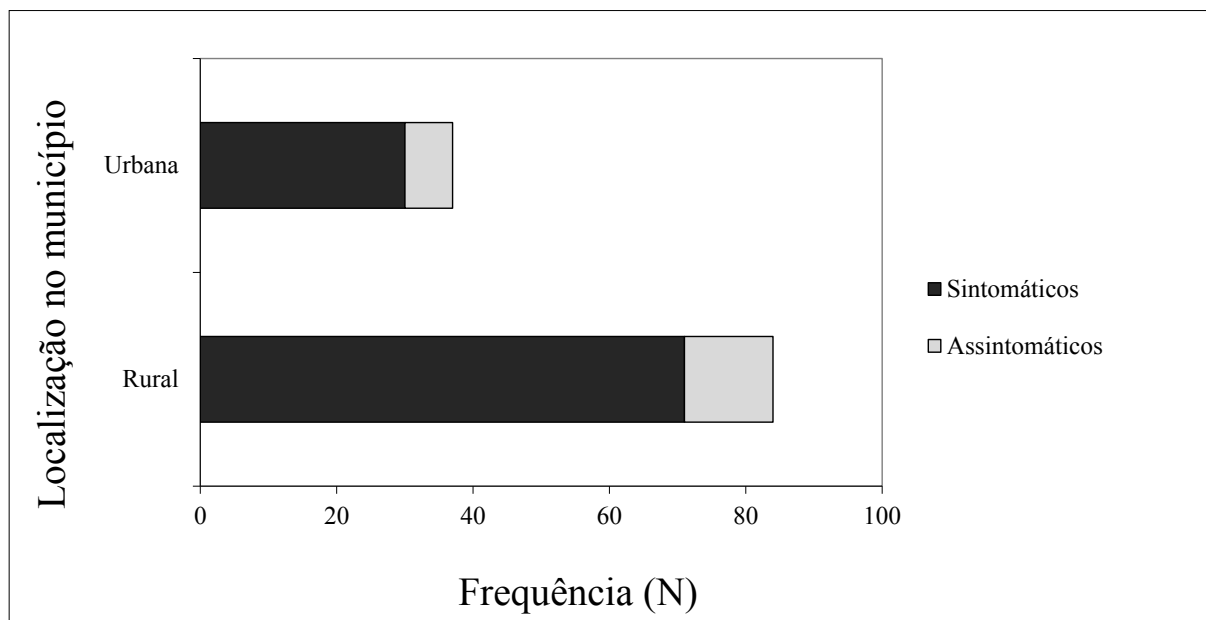
(URSINE, 2014), associados a apenas 6 casos de LV humana durante todo esse período (dados obtidos no SINAN). No período de 2016 a 2018 (Anexo A), foi observado um aumento da soropositividade canina na região, tanto urbana quanto rural, associado a 8 casos de LV humana, neste mesmo período. Neste trabalho foi confirmado o crescente aumento do número de casos da LVC na região, o que pode contribuir para uma elevação de casos humanos. Este perfil e correlação das altas taxas de LVC e aumento dos casos de LV humano já foram relatados em outras regiões (OLIVEIRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2018).

Os dados de frequência nas áreas avaliadas do município de Diamantina, apresentaram um perfil mais elevado do que observado em outras cidade mineiras do interior, como de 10,6% em Juatuba (BORGES *et al.*, 2014), de 9,7% em Montes Claros (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003), de 4,2% em Paracatu (DIAS *et al.*, 2011) e de 14,8% em Ipatinga (LANA, 2018). Essa elevada soropositividade encontrada para a LVC em Diamantina pode estar relacionada à atual situação de expansão do ambiente urbano e ao aumento do número de habitantes nos bairros da periferia da cidade. Outra possível explicação seria o fato deste estudo ter sido conduzido junto à rede municipal de controle de zoonoses, o qual realiza o inquérito canino por demanda, ou seja, para aqueles animais que apresentam suspeita e/ou algum sinal sugestivo para LVC, o que pode levar à uma superestimação dos dados de frequência. Este mesmo perfil elevado de LVC, foi observado também por Matos *et al.* (2006), Menezes (2011) e Costa *et al.* (2018), onde foi realizado inquérito sorológico censitário da LVC associado aos programas de zoonoses locais. Matos *et al.* (2006) num levantamento realizado cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, mostraram alta taxa de LVC (28% de casos confirmados), a partir de dados obtidos do inquérito censitário do Hospital Veterinário da região, que atende, na maioria dos casos, animais sintomáticos ou com contato a outros animais soropositivos.

Na figura 10 mostra a distribuição dos animais classificados como sintomáticos ou assintomáticos de LVC, nas diferentes áreas avaliadas. Devido às características do estudo, a maior parte desses animais sororreativos foram classificados como sintomáticos (83,5%), apresentando pelo menos um sinal clínico característico da LVC. Em outros estudos, foi mostrado que esse perfil é pouco comum, onde cerca de 40 a 60% dos animais com LVC são clinicamente saudáveis, ou seja, são animais assintomáticos (SILVA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2009; BRASIL 2006; BARATA *et al.* 2013). Este fato também é justificado devido ao perfil do estudo por demanda, que avalia animais com suspeita ou presença de algum sinal clínico, aumentado assim, o percentual de animais sintomáticos neste estudo.



**Figura 10** - Distribuição da frequência da Leishmaniose Visceral Canina de acordo com a sintomatologia dos cães residentes das áreas urbana e rural do município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

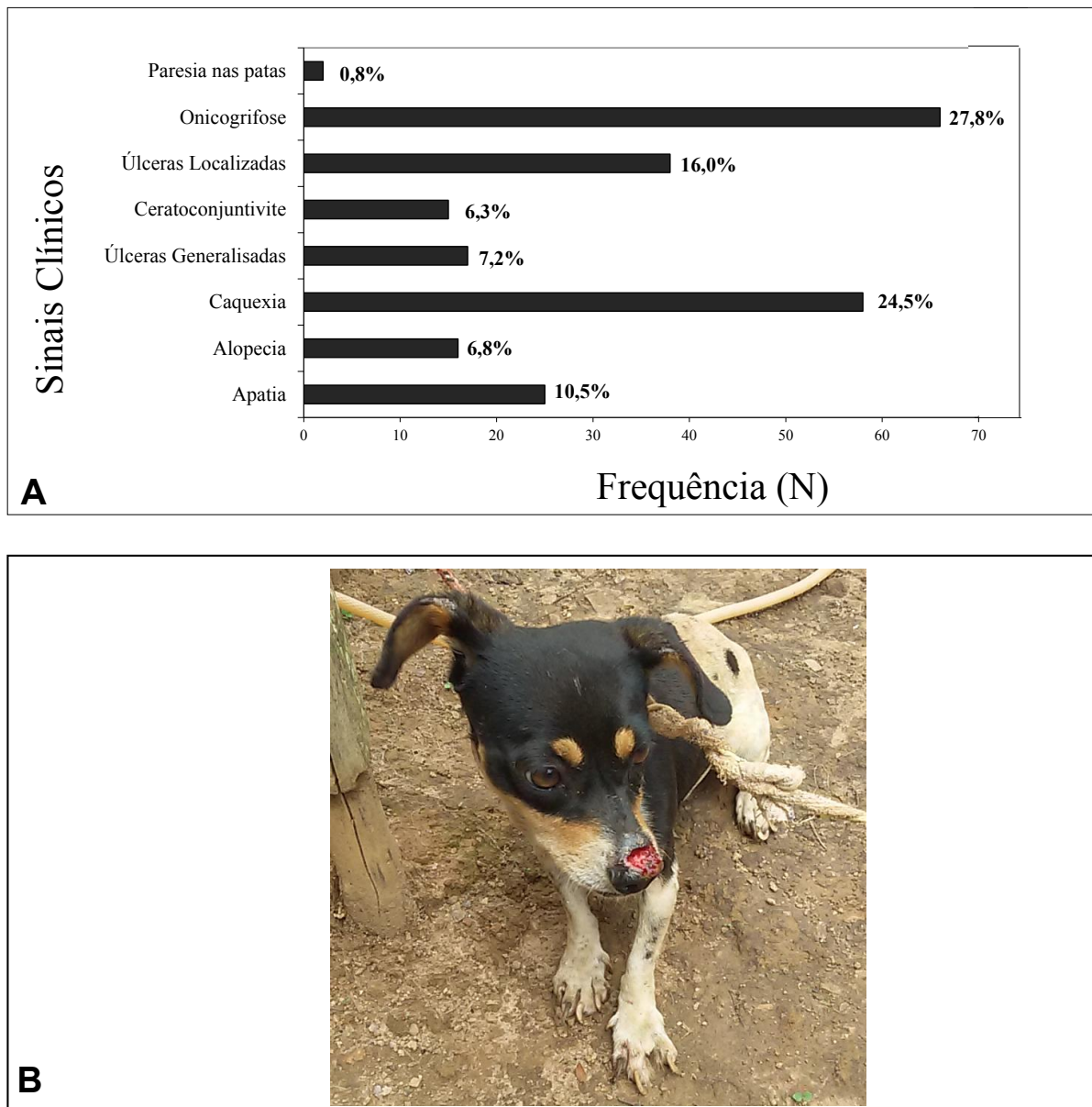


Fonte: Próprio Autor.

Os sinais clínicos observados nos animais com LVC estão descritos na figura 11, sendo que os mais frequentes foram onicogrifose (27,8%), caquexia (24,5%) e úlceras localizadas (16,0%), enquanto o sinal menos frequente foi a paresia nas patas (0,8%). Estes dados estão condizentes com observações feitas em outros estudos (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; KOUTINAS *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001; BANETH *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2006; BANETH *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; BARATA *et al.*, 2013).

Baneth *et al.* (2008) mostraram em uma revisão sistemática, que a LVC é uma doença multisistêmica com sinais clínicos bastante variáveis, mas que a maioria dos animais sintomáticos apresentam caquexia, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia e descamação excessiva da pele. Segundo o levantamento bibliográfico, o percentual de descamação e lesões de pele varia de 81 a 89%; linfedema varia de 62 a 90%; esplenomegalia varia de 10 a 53%; problemas oculares varia de 16 a 81%; onicogrifose varia de 20 a 31%, e a caquexia de 10 a 48%, corroborando com os achados clínicos deste estudo. No estudo realizado por Almeida *et al.* (2009), a maioria dos animais sororreagentes eram assintomáticos, mas dentre os animais com sinais clínicos foi observado principalmente lesões dermatológicas (alopecia, úlcera de ponta de orelha e descamação), sinais viscerais (linfadenomegalia, esplenomegalia), distúrbios oftálmicos (conjuntivite) e onicogrifose.

**Figura 11** - Frequência dos sinais clínicos dos animais com Leishmaniose Visceral Canina, no município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.



A – Distribuição da frequência dos sinais clínicos observados nos animais; B – Animal com sinais característicos de LVC: lesão de focinho e onicogribose. Fonte: Próprio Autor.

Neste estudo foram avaliadas algumas características dos animais sororreativos para LVC, tais como sexo, raça, tipo de pelo e local de residência. Os dados obtidos correlacionando essas características com a frequência da LVC estão apresentadas na tabela 3. A partir destes dados, foi possível observar que existe uma correlação estatisticamente significativa entre o

tipo de sexo ( $p = 0,03$ ) e raça ( $p = 0,02$ ). Já para as características de local de residência (urbana ou rural) e tipo de pelo (curto ou longo) não houve uma correlação estatisticamente significativa. Quanto ao sexo, foi observado uma maior frequência nos machos (26,2%) em comparação as fêmeas (17,9%), enquanto, para raça foi observado que animais de raça definida (RD) houve uma maior frequência de LVC (31,0%) em relação aos animais Sem Raça Definida (SRD) ou chamados de “vira-lata” (20,3%). Esse mesmo resultado foi encontrado por Fernandes (2018), num estudo realizado em região de Torres Vedras, Portugal. Este autor observou que a maior percentagem dos animais com LVC eram do macho (60%) e da raça SRD (20%). Desta forma, para as variáveis independentes cujo valor- $p$  foi menor que 0,20, foram incluídas no modelo multivariado, de Regressão de *Poisson* com variância robusta, para determinar a associação com o desfecho de LVC, medida pela RP. Os dados obtidos nesta análise estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 3** - Distribuição da frequência dos casos de Leishmaniose Visceral Canina correlacionada com as características dos animais, do município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

Variáveis		Positivo para LVC		Negativo para LVC		valor- <i>p</i>
		Frequência (%)	IC (95%) <sup>1</sup>	Frequência (%)	IC (95%)	
Sexo	Fêmea (n= 229)	17,9	(13,5 - 23,4)	82,1	(76,6 - 86,5)	0,0300 <sup>2</sup>
	Macho (n= 305)	26,2	(21,6 - 31,4)	73,8	(68,6 - 78,4)	
Raça (agrupada)	RD (n = 116) <sup>3</sup>	31,0	(23,3 - 39,9)	69,0	(60,1 - 76,7)	0,0209 <sup>2</sup>
	SRD (n = 418) <sup>4</sup>	20,3	(16,8 - 24,5)	79,7	(75,5 - 83,2)	
Tipo de pelo	Curto (n = 500)	22,0	(18,6 - 25,8)	78,0	(74,2 - 81,4)	0,2365 <sup>2</sup>
	Longo (n = 34)	32,4	(19,1 - 49,2)	67,6	(50,8 - 80,9)	
Zona Residencial	Rural (n = 382)	22,0	(18,1 - 26,4)	78,0	(73,6 - 81,9)	0,6373 <sup>2</sup>
	Urbana (n = 152)	24,3	(18,2 - 31,7)	75,7	(68,3 - 81,8)	

<sup>1</sup> Intervalo de confiança (95%). <sup>2</sup> Teste Qui-quadrado de *Pearson*. Significativo se  $p < 0.20$ . <sup>3</sup>RD: raça definida; <sup>4</sup>SRD: sem raça definida.

**Tabela 4** - Análise multivariada pela Regressão de *Poisson*, com variância robusta para animais com Leishmaniose Visceral Canina do município de Diamantina, (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

Variáveis		LVC (%) <sup>1</sup>	RP <sup>2</sup>	IC (95%) <sup>3</sup>	valor- <i>p</i> <sup>4</sup>
Sexo	Fêmea	17,9	1,00	---	---
	Macho	26,2	1,41	(1,01 - 1,98)	0,0461
Raça (agrupada)	RD <sup>5</sup>	31	1,46	(1,04 - 2,05)	0,0270
	SRD <sup>6</sup>	20,3	1,00	---	---

<sup>1</sup> Frequência da Leishmaniose Visceral Canina (%); <sup>2</sup> Razão de frequência ajustada pela Regressão de *Poisson* com variância robusta; <sup>3</sup> Intervalo de confiança (95%); <sup>4</sup> Regressão de *Poisson* (significativo se  $p < 0.05$ ); <sup>5</sup>RD: raça definida; <sup>6</sup>SRD: sem raça definida.

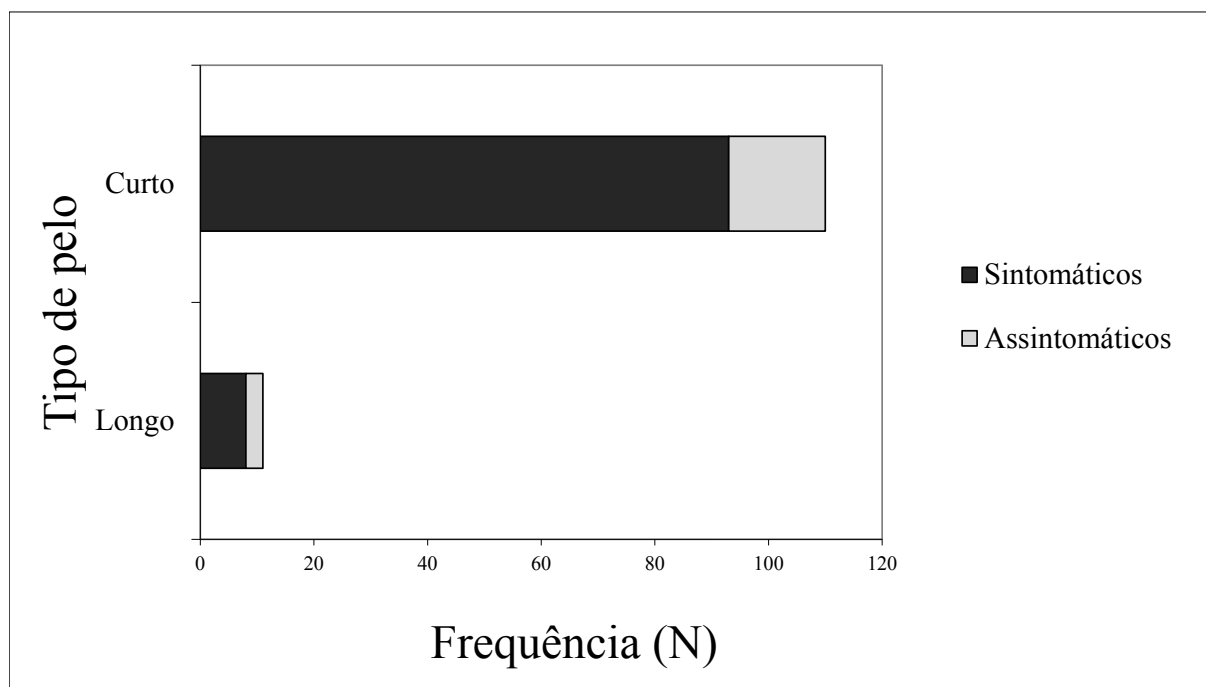
Em áreas endêmicas, diversos fatores relativos ao hospedeiro, tais como sexo, idade, genética, estado nutricional ou infecções concomitantes, podem desempenhar um papel fundamental na resposta do cão à infecção (SIDERIS *et al.*, 1996; PALATNIK *et al.*, 2001; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Atualmente, existem alguns estudos que apontam sobre os fatores de risco da LVC associados às características fenotípicas e genéticas dos animais, porém nem sempre são consensuais, variando muito dependendo do local de estudo. De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da LVC no Brasil (2006), não foi verificada comprovação de predisposição de LVC quanto às diferenças de raça, sexo ou faixa etária (BRASIL, 2006).

Num estudo clínico no município de Araçatuba, São Paulo, com 215 cães naturalmente acometidos por LVC, Feitosa *et al.* (2000) verificaram que não houve predisposição sexual ou etária nos cães doentes. O mesmo resultado foi observado num estudo realizado por Almeida *et al.* (2009), que mostrou não haver correlação estatística entre a LVC e a predominância sexual, etária e racial, para os animais avaliados na região de Cuiabá, Mato Grosso. No presente estudo, ao contrário do observado por esses autores (FEITOSA *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2009), houve uma correlação de frequência do macho, indicando que a chance de machos terem a LVC é 41 vezes ( $p = 0,0461$ ) maior que as fêmeas, enquanto a correlação de frequência em animais RD ter LVC é 46 vezes ( $p = 0,0270$ ) maior que em animais SRD. O fator sexo também foi observado por Lanotte *et al.* (1975), Palatnik *et al.* (2001), Julião *et al.* (2007), Miranda *et al.* (2008) e Barboza *et al.* (2009), que apontaram uma maior propensão para a doença em animais machos.

Entretanto para outros autores, o fator sexo parece não ter relevância quanto o acometimento da LVC (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FEITOSA *et al.*, 2000; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; NAVEDA *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2009). Para França-Silva *et al.* (2003), a suscetibilidade a *L. infantum chagasi*, ocorre independentemente do sexo ou idade, mas o fator tipo de pelo, de acordo com as diferentes raças, parece desempenhar um papel importante na taxa de frequência de LVC. Outros estudos também têm apontado que animais de pelo curto possuem uma maior propensão de contrair a doença, já que a menor pelagem permite uma maior facilidade de acesso dos flebotomíneos ao local da picada (SIDERIS *et al.*, 1996; PALATNIK *et al.*, 2001; MOREIRA-JR *et al.*, 2003; JULIÃO *et al.*, 2007; BARBOZA *et al.*, 2009; BARATA *et al.*, 2013).

No presente estudo não foram observadas correlações significativas quanto ao tipo de pelo e a LVC. Porém, houve uma tendência de que a maioria dos animais sororreativos também apresentavam pelo curto (90.9%), corroborando com os achados dos estudos anteriores. A distribuição dos animais sintomáticos e assintomáticos quanto ao tipo de pelo está apresentado na figura 12.

**Figura 12** - Distribuição dos animais com Leishmaniose Visceral Canina de acordo com o tipo de pelo (curto ou longo) e frequência de sintomatologia, no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.



Fonte: Próprio Autor.

A distribuição dos animais com LVC quanto à classificação de raça está apresentada na tabela 5, e na tabela 6 se encontra a correlação entre a raça e o tipo de pelo do animal. Analisando os dados, foi possível perceber que os animais das raças Pastor Alemão (50%), Foxhound Americano (37,7%), Pinscher (26,1%) e Labrador (25%) apresentaram maior frequência de LVC. Dentre essas raças, a maioria é de pelo curto, exceto o Pastor Alemão, reforçando ainda mais que o tipo de pelo apresenta correlação ao risco de LVC, possivelmente devido a maior suscetibilidade a picada do vetor. Porém, apesar de apresentar pelagem longa, a raça Pastor Alemão já foi apontada ter maior suscetibilidade a doença (ABRANCHES *et al.*, 1991b; RANQUE *et al.*, 1997). Assim como a raça Foxhounds, que num inquérito sorológico se mostrou mais predominante nos Estados Unidos (18 estados) e Canadá (2 províncias), possuir altas taxas de LVC (DUPREY *et al.*, 2006). Outras raças, também tem sido apontadas apresentar predisposição a LVC, tais como as raças Labrador, Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Doberman, Beagle e Mastim Napolitano (SIDERIS *et al.*, 1996; 1999; FRANCA-SILVA *et al.*, 2003; BANETH *et al.*, 2008; CORTES *et al.*, 2012).

No presente estudo, as raças Boiadeiro Australiano (0%), Husky siberiano (0%) e Poodle (4,9%) apresentaram menor frequência de LVC. Resultado semelhante foi observado por Franca-Silva *et al.* (2003), que indicaram as raças Husky Siberiano, Dálmata, Weimaraner, Boxer, Cão Pastor da Bélgica, Fox Terrier, Dogue Alemão e Chihuahua como menos prevalentes à doença. Porém, para se conseguir melhores efeitos de correlação são necessários mais estudos neste sentido. Analisando os animais classificados como SRD, foi possível perceber que a frequência relativa global foi de 20,3%, porém este valor está mais associado à presença de animais de pelo longo (35,3%) em relação ao de pelo curto (19,7%), reforçando mais uma vez que o tipo de pelagem influencia na frequência da doença.

**Tabela 5** - Distribuição da ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina com relação à raça dos cães domiciliados no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano 2019.

Raças	Sororreativo para LVC	
	Frequência (%)	IC (95%) <sup>1</sup>
Boiadero Australiano (n = 3)	0	(0 - 56,1)
Foxhound Americano (n = 61)	37,7	(26,6 - 50,3)
Husky siberiano (n = 3)	0	(0 - 56,1)
Labrador (n = 4)	25	(4,6 - 69,9)
Pastor Alemão (n = 4)	50,0	(15 - 85)
Pinscher (n = 23)	26,1	(12,5 - 46,5)
Pit Bull (n = 8)	12,5	(2,2 - 47,1)
Poodle (n = 10)	4,9	(1,7 - 13,5)
SRD (n = 418) <sup>2</sup>	20,3	(16,8 - 24,5)

<sup>1</sup> Intervalo de confiança (95%); <sup>2</sup>SRD: sem raça definida.



**Tabela 6** - Características dos animais (raça e tipo de pelo) associadas à frequência da Leishmaniose Visceral Canina nas áreas urbana e rural do município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2019.

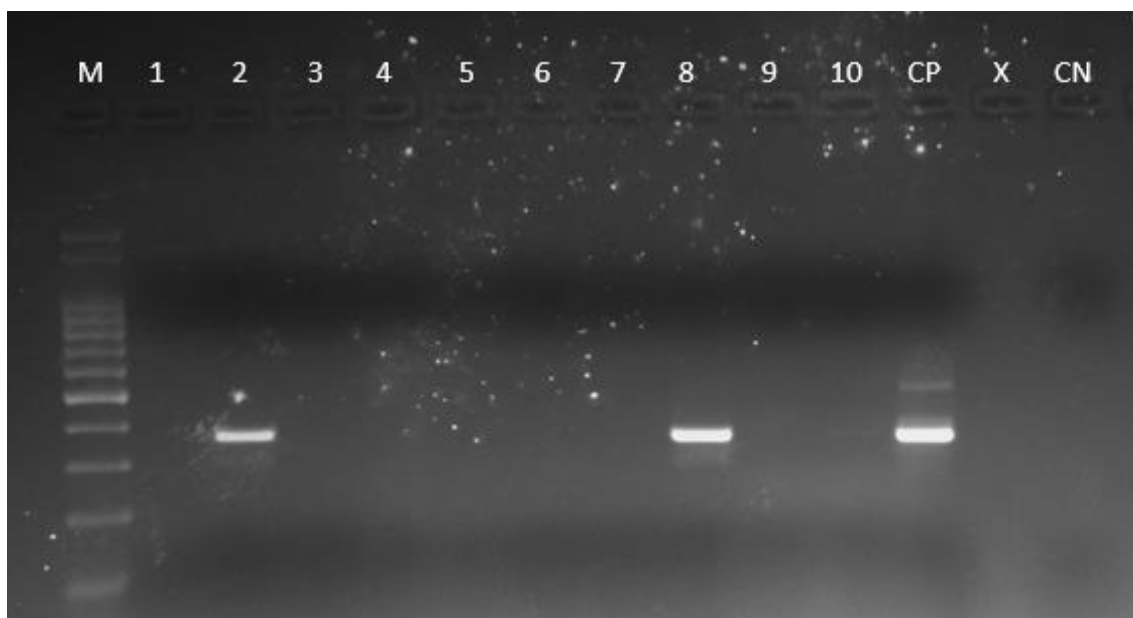
Tipo de pelo	Raça	Distribuição Relativa (%)		Animais examinados (N)	Animais sororeagentes		Frequência (%)
		AU <sup>1</sup>	AR <sup>2</sup>		AU <sup>1</sup>	AR <sup>2</sup>	
Curto	SRD <sup>3</sup>	99	302	401	26	53	19,7
	Foxhound Americano	7	54	61	2	21	37,7
	Pinscher	17	6	23	4	2	26,1
	Pit Bull	6	2	8	1	0	12,5
	Labrador	3	1	4	1	0	25
	Boiadeiro Australiano	3	0	3	0	0	0
Longo	SRD <sup>3</sup>	7	10	17	1	5	35,3
	Poodle	9	1	10	2	1	30
	Pastor Alemão	1	3	4	0	2	50
	Husky siberiano	0	3	3	0	0	0
Total		152	382	534	37	84	-

<sup>1</sup>AU: Área urbana; <sup>2</sup>AR: Área rural; <sup>3</sup>SRD: sem raça definida.

No presente estudo também foi avaliado amostras de sangue periférico para determinação da espécie específica de *Leishmania* circulante. O resultado obtido dos produtos de amplificação de DNA dos cães, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% está apresentado na figura 13. Os dados mostraram que duas amostras avaliadas apresentaram positividade para a *Leishmania* sp. confirmando o diagnóstico da doença na região de Diamantina.

Em outras cidades mineiras tem sido observado resultados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa. Num estudo realizado na cidade de Paracatu, Minas Gerais, foi observado uma taxa de 4,2% de LVC com identificação das espécies *L. chagasi* e *L. amazonensis*, como responsáveis pela doença natural dos cães. Esta última espécie está geralmente associada à leishmaniose tegumentar, sendo um forte indicativo da versatilidade e papel do cão no ciclo de transmissão de diferentes formas clínicas e da manutenção da doença na área urbana.

**Figura 13** - Produtos de amplificação de DNA de cães, obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.



Canaletas: M- peso molecular 100 pb. 1 a 10: amostras testadas; CP- Controle positivo (*L. chagasi* - cepa de referência MHOM/BR/PP75); CN- Controle negativo (Sem DNA); Amostras com 359 pb.

Assim como no presente estudo, Almeida *et al.* (2012) num estudo realizado na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, também observaram que dos 13 animais sororreagentes, 6 deles apresentaram negatividade para o teste de PCR, nas diferentes amostras usadas (aspirado de fígado, linfonodo e medula óssea). Os autores associaram essa discordância de resultados a uma possível presença de anticorpos remanescentes após eliminação do parasito (cura do animal) ou a ocorrência de uma possível reação cruzada na sorologia com outros parasitos, como *Trypanosoma*. Este achado revelou um dos problemas dos ensaios sorológicos, que podem apresentar um certo grau de resultados falso-positivo, especialmente após cura do animal (VEXENAT *et al.*, 1996; ALVES & BEVILACQUA, 2004; GOMES *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013).

A amplificação de DNA através da PCR representa uma alternativa vantajosa, altamente sensível e específica na detecção, caracterização e identificação de espécies de *Leishmania* sp. em amostras clínicas e reservatórios infectados (MULLER *et al.*, 2003; PITA-PEREIRA *et al.*, 2005; MICHALSKY *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2011). Porém, segundo Francino *et al.* (2006), apesar do PCR ser uma técnica com altas taxas de sensibilidade e especificidade, pode ocorrer falsos negativos quando o número de parasitas em uma amostra é muito pequeno. Além disso, Ikonomopoulos *et al.* (2003), que o tipo de amostra usada no PCR pode influenciar os resultados. Os autores mencionaram que amostras de grande volume, como os obtidos por punção de medula óssea oferece maiores taxas de detecção de DNA do parasita. Assim, talvez o uso de amostras de sangue periférico possa ter reduzido a sensibilidade da técnica. Este fato pode ser reforçado com os dados obtidos por Barboza *et al.* (2009), que no seu estudo observou que todas as amostras de sangue periférico analisadas em PCR, não foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* sp, apesar da sororreatividade e sinal clínico dos animais avaliados.

Em suma, neste estudo, o PCR mostrou que a espécie responsável pela LVC na região foi *Leishmania* sp., possivelmente a *L. infantum chagasi*, a principal espécie infectante das Américas. Os dados obtidos mostraram que o município de Diamantina apresenta elevada frequência da LVC e que a doença se encontra em processo de urbanização, especialmente nos bairros periféricos. Este fato predispõe um maior risco de aumento dos casos humanos, fazendo-se necessárias medidas educativas/conscientização, controle dos vetores e, especialmente eliminação dos reservatórios caninos na região.

Além disso, foi apontado que sexo, raça e tipo de pelo podem ser fatores de risco da LVC, reforçando o papel do cão na cadeia de transmissão da doença e do risco de casos humanos. As medidas de educação/conscientização e eutanásia dos animais infectados foram realizadas neste estudo, além de propiciar a construção de um mapa georreferenciado da área urbana, que pode ser usado para um melhor planejamento de ações de controle e vigilância nas regiões de maior risco do município. Levando em consideração a frequência e a complexidade dos fatores associados à LVC tornam o seu gerenciamento e controle muito desafiador, especialmente em regiões endêmicas carentes e desfavorecidas como o município de Diamantina, MG, fazendo necessário novos estudos e ações sanitárias nesta área, especialmente na identificação dos fatores de risco, diagnóstico e eliminação dos reservatórios caninos.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ Foi observado uma alta frequência da LVC na área rural, mas com indício de urbanização da doença no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil);
- ✓ A presença de onicogrifose, caquexia e úlceras localizadas foram os sinais mais constantes em animais sororreagentes;
- ✓ Cães machos e de raça RD podem apresentar maiores fatores de risco para a LVC;
- ✓ Houve uma tendência dos animais de pelo curto (90,9%) de apresentarem a LVC, indicando esta característica fenotípica como um possível fator de risco;
- ✓ As raças Pastor Alemão, Foxhound Americano, Pinscher e Labrador apresentaram maior frequência da LVC, do que outras raças;
- ✓ A espécie responsável pela doença canina no município foi a *Leishmania* sp.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. *et al.* An experimental model for canine leishmaniosis. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 537-550, 1991a.
- ABRANCHES, P. *et al.* Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 557-561, 1991b.
- ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 27, n. 2, p. 71-86, 2009.
- ABREU, P. A. A.; FRAGA, L. M. S.; NEVES, S. C. Geologia. In: SILVA, A. C.; PEDREIRA, L. V. S. F.; ABREU, P. A. A. **Serra do Espinhaço Meridional, paisagens e ambientes**. Belo Horizonte: O Lutador, Cap.1. 17-45. 2005.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean kala-azar. II - *Leishmania infantum*. **Proceedings of Royal Society of London**, v. 108, p. 453-502, 1931.
- AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C. Bioecologia dos vectores. In: SANTOS GOMES, G. M.; FONSECA, I. M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 27-40, 2008.
- AKHOUNDI, M. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004770, 2016.
- ALCOLEA, P. J. *et al.* Temperature Increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11-31, 2010.
- ALENCAR, J. E.; CUNHA, R. V. Inquérito sobre calazar no Ceará-Novos resultados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, Rio de Janeiro**, v. 15, p. 391-403, 1963.
- ALMEIDA, M. A. O. *et al.* Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 151-158, 2005.
- ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, mar./abr., 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na Cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Characterization of canine leishmaniasis by PCR-RFLP in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 2, p. 68-72, 2012.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, (Minas Gerais, Brasil) 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

ANDRADE, B. B. et al. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 122-127, 2007.

ANDRADE, A. J. D. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e170377, 2018.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ATTA, A. M. et al. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 525-530, 2004.

AZEVEDO, J. F.; NEVES, V. M. La leishmaniose canine à Lisbonne. **Annales Parasitologie, Paris**, v. 38, p. 741-755, 1963.

BANETH, G. et al. Canine Leishmaniosis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315-324, 2002.

BANETH, G. *et al.* **Leishmanioses: Doenças Infecciosas do cão e do gato**. CE Greene (Ed.), 3ª ed., Saunders. pp. 685-698, 2006.

BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARATA, R. A. *et al.* Avaliação do controle de flebotomíneos (Diptera, *Psychodidae*) usando cipermetrina em área endêmica para leishmaniose visceral, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 27, n. 11, p. 2117-2123, nov. 2011a.

BARATA, R. A. *et al.* Controle da leishmaniose visceral no município de Porteirinha, estado de Minas Gerais, no período de 1998 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 386-388, 2011b.

BARATA, R. A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 405083, 2013.

BARBOSA, I. R. Epidemiologia da leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 1, p. 17-21, 2013.

BARBOZA, D. C. P. M. *et al.* Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 152-163, 2006.

BARBOZA, D. C. P. *et al.* Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 434-447, abr./jun. 2009.

BARRETTO, A.V.P. Anclivepa-MG realizou debate sobre a leishmaniose. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 11, n. 64, p. 28-30, 2006.

BESTEIRO, S. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.

BENITES, A. P. *et al.* Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.



BISETTO JUNIOR, A. *et al.* **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas.** Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. Conselho Regional de Medicina Veterinária. Universidade de Londrina: Paraná, 2015. 44 p.

BONNEY, K. M. Promoting civic engagement with neglected tropical disease education. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 23-26, 2016.

BOGDAN, C. *et al.* Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology, London**, v. 8, p. 517-525, aug. 1996.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology, Oxford**, v. 28, n. 1, p. 121-134, jan. 1998.

BOGGIATTO, P. M. *et al.* Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 2011.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 12, n. 71, p. 44-48, 2007.

BORGES, L. F. M. *et al.* Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 44, n. 2, p. 352-357, 2014.

BOURDOISEAU, G. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, p. 21-30, 1997.

BOURREAU, E. *et al.* High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1628-1630, dez. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de controle e controle da leishmaniose visceral. MS, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de Julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação de Leishmaniose

Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Secretaria de vigilância em saúde do governo do Rio Grande Do Sul. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2017 v. 3 /1. ed. Atual.

BRITO, F. L. C. *et al.* Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; LAUS, J. L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 64, p. 68-74, 2006.

BURRACO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis Associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 29-30, 1997.

CABRERA, M. A. A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**. v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO, J. B. *et al.* Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 12, n. 71, p. 86-92, 2007.

CARDOSO, L. *et al.* Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). **Veterinary Parasitology**, v. 121, p.21–32, 2004.

CARVALHO NETA, A.V. *et al.* Panoftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 12, n. 66, p. 52-56, 2007.

CAVALCANTE, I. J. M.; VALE, M. R. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 911-924, 2014.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAGAS, E. *et al.* Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 189-229, 1938.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 67-75, 2005.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by leishmania infantum. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian-North American Edition**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

COELHO, W. M. D. *et al.* Occurrence of *Leishmania chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 256-258, 2010.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of the Piauí, Brazil (1980-1986). **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, C. H. N. *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Disease**, v. 182, p. 997- 1000, 2000.

COSTA, R. T. *et al.* Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics, and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, D. N. C. *et al.* Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 92, 2018.

CORTES, S. *et al.* Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 189- 196, 2012.

CORTESE, L. *et al.* An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy. **BioMed Central Veterinary Research, London**, v. 11, p. 295, 2015.

COUTINHO, M. T. Z. *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1-10, 2011.

CRINGOLI, G. *et al.* Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 307-313, 2002.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 142–144, 2000.

CUPOLILLO, F. **Diagnóstico Hidroclimatológico da Bacia do Rio Doce**. 2008. 153 f. Tese (Doutorado em Geografia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

DA CRUZ, A. M. *et al.* Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, Jun. 1994.

DANTAS TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DANTAS TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DANTAS TORRES, F. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, p. 857–60, 2010.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New 31 Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology, Oxford**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS TORRES, F. *et al.* Leishmania FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 31, p. 3165-69, 2017.

DE FREITAS, E. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

DE OLIVEIRA, L. C. P. *et al.* Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

DE SOUSA, N. M. P. **Avaliação in vitro da atividade leishmanicida da 5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tiona sobre formas adaptativas livres de *Leishmania (L.) amazonensis* e na infecção experimental.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília. DF, 2014.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará.** 1956. 162 f. Tese (Doutorado em Educação Sanitária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DEN BOER, M. *et al.* Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471-1477, 2011.

DESPLAZES, P. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DIAS E. S. *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 101-111, 2011.

DING, L. *et al.* IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **The Journal of Immunology, New York**, v. 151, n. 3, p. 1224-1234, 1993.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M. Genital lesion associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 650-658, 2005.

DUPREY, Z. H. *et al.* Leishmaniose visceral canina, Estados Unidos e Canadá, 2000-2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 440-446, 2006.

DYE, C.; DAVIES, C. R.; LAINSON, R. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. **Animal Behaviour**, v. 42, p. 183-192, 1991.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNANDES, M. R. **Leishmaniose Canina**. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, Portugal, 2018.

FERRARI, H. F.; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M. C. R. Miocardite Associada a *Leishmania* sp em cão - Relato de caso. In: Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, 2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina**, 2006. 48 p.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). **Proceedings of a canine leishmaniasis forum, Barcelona**, v. 28-31, p. 6-10, 1999.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. Department of Animal Medicine and surgery. **Veterinary School, University of Barcelona**, v. 28, n. 3, p. 21-24, 2002.

FERREIRA, C. *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235-241, 2007.

FERROGLIO, E. *et al.* Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 162-166, 2007.

FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Leishmaniose visceral canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026-1030, 2012.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. S. N. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 105, p. 573, p. 11-20, 2010.

FREITAS, J. C. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

FUNASA. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. **Boletim Epidemiológico**, 1999.

GALLETTI, E. *et al.* Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 243-245, 2011.

GIANOTTI, A. R. C. **Caracterização Fitoclimática em duas Formações Rupestres do Bioma Cerrado**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2012.

GIUNCHETTI, R.C. *et al.* A killed 54 *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, p. 623-638, 2008.

GOMES, Y. M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. **Sevilla: Hoechst Roussel Vet**, p.7-14, 2002.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, 23-30, 2011.

GREENE, C. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**. 4º ed. Editora Roca: São Paulo 2015.

GRIMALDI, G. Jr. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet**, v. 83, p. 93-101, 2002.

GUSMÃO, J. D.; BRITO, P. A.; LEITE, M. T. S. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no Norte de (Minas Gerais, Brasil) no período de 2007 a 2011. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 615-624, 2014.

HAILU, A. *et al.* T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and symptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v. 117, p. 182-191, 2005.

HATAM, G. R. *et al.* Isoenzyme and ultrastructural characterization of *Leishmania tropica* axenic amastigotes and promastigotes. **Parasitology Research**, v. 112, p. 643-648, 2013.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology, London**, v. 132, p. S19-S32, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados da cidade de Diamantina, MG, 2019.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/diamantina.html>. Acesso em 23/07/2020.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 12, n. 71, p. 34-42, 2007.

IKONOMOPOULOS, J. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 77-81, 2005.

JULIÃO, F. S. *et al.* Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KAZIMOTO, T. A. *et al.* Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, p. 356-363, 2018.



KRAUSPENHAR, C. *et al.* Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-383, 1999.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **New World Leishmaniasis – The Neotropical Leishmania Species**. Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., volume 5, Parasitology, Arnold: London, p. 242-266, 1998.

LANA, R. S. **Ecoepidemiologia da leishmaniose visceral no município de Ipatinga, Região Metropolitana do Vale do Aço, estado de Minas Gerais, Brasil**. 2018. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2018.

LANGONI, H. *et al.* American visceral leishmaniasis: a case report. **The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 11, p. 361-372, 2005.

LANOTTE, G. *et al.* Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. VIII. Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques moyens dans la leishmaniose canine. **Annales de Parasitologie, Paris**, v. 50, p. 1-5, 1975.

LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária**. São Caetano do Sul: Interbook, p. 313-344, 2016.

LEITE, A. I.; ARAÚJO, L. B. Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 3, p. 301-308, 2013.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in Índia. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1252-1254, 1903.

LEONTIDES, L. S. *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19-27, 2002.

- LIMA, V. M. F. *et al.* Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 36, p. 485-489, 2003.
- LIMA, W. G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.
- LIMA, I. S. *et al.* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p.1-9, 2014.
- LINHARES, G. F. C. *et al.* Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 69-72, 2005.
- LOPEZ-PEÑA, M.; ALEMAN, N.; MUNOZ, F. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 1-3, 2009.
- LOPEZ, R. *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, p. 469-474, 1996.
- LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, 2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral Canina**, 2006, p.15-22.
- MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 25, p. 247-258, 2016.
- MADEIRA, M. F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.
- MAIA, C. S. *et al.* A percepção dos fatores de risco associadas a Leishmaniose Visceral Americana em Petrolina, Pernambuco, Brazil. **Medicina Veterinária, Recife**, v. 7, n. 4, p. 19-25, 2013.
- MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 82, p. 566-567, 1988.

MANNA, L. *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341- 352, 2013.

MAROLI, M. *et al.* Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 358-363, 2001.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARQUES, N. T. A. *et al.* Geoprocessamento aplicado à epidemiologia da leishmaniose visceral. **Hygeia**, v. 13, n. 26, p. 156-165, 2017.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MATOS, M. M. *et al.* Ocorrência da Leishmaniose Visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 51-54, 2006.

MATTOS JR., D. G. *et al.* Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 188–189, 2000.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Ed. Editora Roca: Rio de Janeiro, 2018.

MENEZES, F. C. **Sistema de Informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte – Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período de 2006 a 2010**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2011.

METTLER, M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 67–76, 2007.

MICHALSKY, E. M. *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba**, v. 44, n. 1, p. 58-62, 2011.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MILES, S. A. *et al.* A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 747-753, 2005.

MIRANDA, S. *et al.* Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 35-38, 2008.

MIRÓ, G. *et al.* Canine Leishmaniosis nem concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MOHAPATRA, S. *et al.* Lipid derangement as diagnostic and prognostic indicator for visceral leishmaniasis patients. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 134-135, 2014.

MOLANO, I. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2003.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 67-72, 1994.

MORAIS, M. H. F. *et al.* Vigilância e controle da leishmaniose visceral no contexto urbano. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 2012, n. 65, p. 44- 73, 2012.

MOREIRA JR., E. D. *et al.* Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393–397, 2003.

MULLER, N. *et al.* PCR based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 223-229, 2003.

NASCIMENTO, M. D. S. B. *et al.* Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 233-240, 1996.

NAVEDA, L. A. B. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 988-993, 2006.

NAUCKE, T. J., LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**. v. 5, p. 67, 2012.

NERY, G. *et al.* Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 701-707, 2017.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NICOLLE C., COMTE C. Origine du Kala azar. **Academy of Science**, v. 146, p. 789, 1908.

NOYES, H. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 657-661, 1998.

NUNES, C. M. *et al.* Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVA, G. *et al.* Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p. 1192-1198, 2010.

OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. **Ciências Rural, Santa Maria**, v. 42, n. 9, p. 1614-1620, 2012.

OLIVEIRA, A.M. *et al.* Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233-242, 2016.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 97-104, 2015.

OWENS, S. D. *et al.* Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PALATNIK, C. B. S. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PANGRAZIO, K. K. *et al.* Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 327-331, 2009.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3, p. 94-102, 2015.

PAZ, G. F. *et al.* Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 131-133, 2010.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 35-41, 2000.

PETERSEN, C. A. Leishmaniasis, An Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. **Top Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 182-188, 2010.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complexrestricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; SLAPPENDEL, R. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 121-126, 1999.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil)

revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 905-913, 2005.

POZIO, E. *et al.* Leishmaniosis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniosis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropical**, v. 38, p. 383-393, 1981.

PROVERBIO, D. *et al.* Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence antibody test for assaying *Leishmania infantum* antibodies in dogs. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

QUEIROZ, N. M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA test. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

QUINNELL, R. J. *et al.* The epidemiology of canine leishmaniosis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**, v. 115, p. 143 – 156, 1997.

QUINNELL, R. J.; COURTENA, Y. O.; SHAW, M. A. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of the Infectious Diseases**, v. 183, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, p. 161-168, 2003.

RAKOTOMANGA, M. *et al.* Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1425–1430, 2007.

RALLIS, T. *et al.* Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2, p. 145-52, 2005.

RANQUE, J. M.; QUILICI, M.; DUNAN, S. Les leishmanioses de la région provençale. Considerations épidémiologiques et écologiques. **Colloque International CNRS Leishmanioses**, v. 239, p. 285-293, 1997.

REGUERA, R. M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 98–114, 2016.

REIS, A. B. **Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção.** 2001. 123 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2001.

REIS, L. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical, São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 103-115, maio/ago. 2006.

REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1, p. 87-95, 2009.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 12, n. 71, p. 66-76, 2007.

RODRIGUES, A. C. M. *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral no Município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1119-1124, 2017.

RODRIGUEZ CORTES, A. *et al.* Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 190-198, 2007.

ROGERS, K. A. *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters, Oxford**, v. 209, n. 1, p. 1-7, 2002.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Controlo of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e584, 2010.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal.**, v. 1903, p. 1401, 1903.

ROSYPAL, A. C. **Characterization of Canine Leishmaniasis in the United States: Pathogenesis, Immunological Responses, and Transmission of an American Isolate of *Leishmania infantum*.** 2005. 179 f. Thesis (Doctoral in of Philosophy In Veterinary Medical Sciences) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute & State University. Blacksburg, VA, 2005.

ROSYPAL, A. C. *et al.* Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.

ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitology**, v. 53, p. 161-171, 2006.



SANTANA-FILHO, F. C. *et al.* Recusas de borrifação de imóveis e ocorrência de casos de leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 899- 908, 2012.

SANTOS-GOMES, G. M. *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, 2009.

SAUQUILLO, M. C. T. La Leishmaniosis canina. 2a Parte. Manifestaciones oculares em la leishmaniosis canina. **Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, v. 22, p. 39-43, 2005.

SCANDAR, S. A. S. *et al.* Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. **Bepa**, v. 8, n. 88, p. 13-22, 2011.

SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. Canine Leishmania Infections – Review. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária.**, v. X, n. 19, p. 1-17, jul. 2012.

SCOTT, P. *et al.* The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 318-338, 2004.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, 2005.

SERRANO, A. C. M. *et al.* Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária, São Paulo**, v. 13, n. 76, p. 36-40, 2008.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 6, p. 412-423, 2009.

SIDERIS, V. L. *et al.* Canine visceral leishmaniosis in the great Athens area, Greece. **Parasite**, v. 3, p. 125-130, 1996.

SIDERIS, V. *et al.* Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **European Journal of Epidemiology**, v. 15, n. 3, p. 271-276, 1999.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 96, n. 3, p. 285–291, 2001.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, F. L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, S. M. *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1/2, p. 150-154, 2010.

SILVA, R. B. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016 .

SILVA, S. T. P. *et al.* Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. **La Revista de Bioética y Derecho**, v. 39, p. 135-151, 2017a.

SILVA, F. A. *et al.* *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) na zona urbana do Município de Rio Tinto, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 4, n. 8, p. 343-354, 2017b.

SLAMA, D. *et al.* First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 51, 2014.

SOLANO-GALLEGÓ, L. *et al.* *Leishmaniasis infantum* - specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGÓ, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGÓ, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGÓ, L. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 98, 2012.

SOUZA, C. M. *et al.* Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 99, n. 8, p. 795-803, Dec. 2004.

SOUZA, A. I. *et al.* Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 51-54, 2005.

SOUZA, Y. C. P. *et al.* Diagnosis tests for visceral leishmaniasis – present and perspectives. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 21, p. 1-16, 2013.

SOUZA, A. P. L.; JESUS, J. R.; TEIXEIRA, M. C. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, v. 11, n. 2, p. 112-118, 2014.

STEINDEL, M. *et al.* Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 490-496, 2013.

TABAR, M. D. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 7, p. 325-328, 2008.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta veterinária em cinco minutos**. Espécies canina e felina. 3º ed., São Paulo: Manole, 2008.

TOEPP, A. *et al.* Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, p. 6433-6441, 2018.

TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS, J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, p. 549-52, 2005.

TRAINOR, K. E. *et al.* F. Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 6, p. 1076–1081, 2010.

TRUJILLO, C. *et al.* The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters, Amsterdam**, v. 70, n. 3, p. 203-209, Dec. 1999.

TURCO, S. J.; SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 223-226, 2001.

URSINE, R.L. **Leishmaniose Visceral em Municípios que compõem a Superintendência Regional de Saúde de Diamantina, com ênfase no Município de Araçuaí, Minas Gerais**. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Ambiente) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infectious by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VIANA, A. G. **Estudo das características funcionais de monócitos humanos infectados *in vitro* com diferentes cepas de *Leishmania* e análise da expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) em linfócitos de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar**. 2016. 141 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2016.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 85-92, 1998.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J. C.; NÜSSLER, A. K. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 253-256, 1996.

WERNECK, G. L. *et al.* The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology**, v. 13, n. 3, p. 364-367, 2002.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.

WERNECK, G. L.; FIGUEIREDO, F.; CRUZ, M. P. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 42, 2018.

World Health Organization. (WHO). Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, March, 2010.

World Health Organization. (WHO). **Global Health Observatory data. Leishmaniasis: situation and trends**. Geneva: World Health Organization; 2013.

World Health Organization. (WHO). Control of the leishmaniasis. World Health Organization, **Technical Report Series**, v. 949, p. 22–26, 2014.

XAVIER, S. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 994-1000, 2006.

XIMENES, M. F. F. M. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil: reflexos do ambiente antrópico. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 128-137, 2007.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surfaceprotease (MSP or GP63) of *Leishmania* spp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, p. 1-16, 2003.

ZAFFARONI, E. *et al.* Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 11-19, 1999.

ZORZETTO, R. Uma doença anunciada, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. **Pesquisa Fapesp, São Paulo**, v. 151, p. 47-51, 2008.

**ANEXO A – Artigo desenvolvido com os dados coletados no período de 2016 a 2018.**

**Ecoepidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of  
Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil)**

Running title: Ecoecoepidemiology of visceral leishmaniasis in Diamantina

The date of submission: 04/01/2020

Fernanda Batista-Santos<sup>a</sup>, Diogo AN Dória<sup>b</sup>, Yrllan R Sincurá<sup>a</sup>, Samuel S Rosário<sup>b</sup>,  
Ricardo T Fujiwara<sup>c</sup>, Ricardo A Barata<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e  
Mucuri, Diamantina, MG, Brazil; <sup>b</sup>Secretaria Municipal de Saúde, Diamantina, MG,  
Brazil; <sup>c</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo  
Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author: Dr. Ricardo Andrade Barata, Universidade Federal dos Vales do  
Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Ciências Biológicas, Campus JK, Rodovia  
MGT 367, Km 583, 5000, Alto da Jacuba, 39.100-000, Diamantina, MG, Brasil. e-mail:  
[ricbarata@hotmail.com](mailto:ricbarata@hotmail.com)

**Keywords:** Epidemiology, Visceral leishmaniasis, Jequitinhonha Valley, Diamantina.

List of abbreviations used

VL: visceral leishmaniasis

CVL: canine visceral leishmaniasis

*Lu: Lutzomyia*

*Le: Leishmania*

Total word count: 2061

Number of tables: 3, figures: 1, and references: 41

Acknowledgments: This work was granted by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-04035-17). Ricardo T. Fujiwara is a Research Fellow of CNPq (Bolsa de Produtividade em Pesquisa)

Author contributions:

Study conception and design: FBS, DAND, SSR, RAB

Acquisition of data: FBS, DAND, SSR, YRS

Analysis and interpretation of data: FBS, DAND, YRS, RAB

Drafting of manuscript: FBS, RAB

Critical revision: RTF, RAB

## **Abstract**

**Background:** The present study was carried out in the rural and urban area of Diamantina/MG, an endemic municipality for visceral leishmaniasis in Brazil. **Methods:** The patient notification record, the canine prevalence and the phlebotomine fauna were evaluated. **Results:** In the period from 2016 to 2018, 8 human cases were confirmed, with 3 deaths, and predominance in males. In the same period, a total of 1,388 dogs domiciled in the rural and urban area of the municipality were submitted to the DPP® and ELISA, with a percentage of confirmed canine cases of 29.9% and 29.4%, respectively. The entomological study conducted in the municipality revealed the presence of 10 species of sand flies, with a predominance of *Lutzomyia longipalpis* (55.75%), mainly in the rural area. **Conclusions:** Unlike what is happening in urban centers, the results of this study suggest that the VL in Diamantina is in the process of urbanization, given the high percentage of confirmed canine cases and the high density of *Lu. longipalpis* in the rural area of the municipality. These risk factors warning about the need for continuous surveillance and control actions of VL in this area.

## INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar is one of the parasitic diseases with the greatest impact on global public health, with an estimated incidence of 500,000 new cases and 60,000 deaths annually [1,2]. In the Americas, about 90% of human cases of VL have been registered in Brazil, with distribution in the five regions and in 26 of the 27 states [3].

In the life cycle of *Leishmania infantum chagasi*, the etiological agent of VL in the New World, the transmission occurs mainly through the bite of female sand flies of the *Lutzomyia longipalpis* species (Lutz & Neiva 1912) [4,5]. The reservoirs include a



wide variety of mammalian hosts, being a common occurrence in rodents, marsupials, canids and humans, which are accidentally affected [6,7], and may have irregular fever, progressive weight loss, hepatosplenomegaly and anemia.

The main reservoir of *Le. infantum chagasi* in the home environment is the dog (*Canis familiaris*), which contributes to the maintenance of the disease cycle [8,9]. Canine enzooty has preceded the occurrence of human cases and the infection in dogs has been more prevalent than in humans. In addition, the presence of dogs and other domestic animals has been identified as one of the main risk factors for the occurrence of infection in humans [10,11].

The environmental changes caused by humans, deforestation, fire, the disordered city growth, the migration of people to the periphery of urban centers, the constant presence of domestic animals and vectors, allied to the problems of basic sanitation, housing and malnutrition have been identified as determining factors for the urbanization and geographical expansion of VL in Brazil [12].

The municipality of Diamantina/MG, located in the Jequitinhonha River Valley, is considered an endemic area for visceral leishmaniasis with moderate transmission (average number of reported human cases in the last three years between 2.4 and 4.4 cases) [12]. However, there are no data about the epidemiology of VL in the municipality. Thus, the objective of this study was to investigate the registration of human cases, to evaluate the prevalence of visceral leishmaniasis in dogs attended by demand and to characterize the phlebotomine fauna in order to provide the first data on the epidemiological triad of VL in the municipality of Diamantina.

## **Study area**

Diamantina is located in the mesoregion of the Jequitinhonha River Valley, in the State of Minas Gerais. It has a population of 45,880 inhabitants [13], distributed over an area of approximately 3,900 km<sup>2</sup>, including 10 districts: Conselheiro Mata, Desembargador Otoni, Extração, Guinda, Inhaí, Mendanha, Planalto de Minas, São João da Chapada, Senador Mourão e Sopa (Figure 1).

The Jequitinhonha River Valley is one of the regions of Minas Gerais with the highest percentages of poverty, illiteracy, infant mortality, fertility rate and low incomes. The region has one of the lowest Human Development Indexes (HDI) in the state of Minas Gerais and occupies one of the worst positions in the country [14]. Diamantina is an urban city small, but is characterized by being pole of the region, with HDI=0.716 [13]. The city offers health and education services to the local and surrounding population. However, the neighborhoods that make up the municipality, characterized as rural area (defined by Master Plan of Municipality), have a high concentration of poverty and difficulty in accessing health services [15,16]. Commonly, the population practices subsistence agriculture and domestic animal breeding, and its residents live in modest homes and in inadequate sanitary conditions.

The region's climate regime is typically wet temperate (Cwb - Köppen classification), characterized by mild and humid summers (October to April) and cooler, drier winters (June to August) [17]. The average annual rainfall varies from 1250 to 1550 mm, with the months of October to April being the rainiest in the last two years. The city is situated at an altitude of 1,280 m. The average annual temperature is in the range of 18° to 19°C, being predominantly mild throughout the year. The relative humidity of the air is almost always high, with annual averages of 75.6%.

### **Human cases of VL**

Data concerning the number of human cases of VL in Diamantina between 2016 and 2018 were obtained from the Municipal Health Department, observing the following characteristics: age group, sex, area of residence and lethality.

### **Canine VL survey**

In the period 2016 and 2018, serological surveys were carried out in order to determine the prevalence of VL in dogs domiciled in the urban and rural areas of the municipality of Diamantina. By phone, the owners of dogs that show suspicion and/or any suggestive sign for CVL contacted the endemic agents at the Zoonosis Control Center, who went to the dog's place of residence to proceed with the clinical investigation and diagnosis. The serological diagnosis of these dogs followed Technical Note N° 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/ SVS/MS), using the TR-DPP® immunochromatographic test (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ/RJ, Brazil) as a screening method and the immunoenzymatic ELISA EIE® assay (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, RJ, Brazil), as a confirmatory method.

### **Entomological studies**

Entomological captures were made in six neighborhoods in the municipality of Diamantina, three of which were considered to be rural (Jambreiro, Maria Orminda and Santo Antônio) and three belonging to the urban area (Consolação, Gruta de Lourdes and Palha). Twelve HP light traps [18] were exposed in peridomicile, which presented canines cases and favorable ecological conditions for the development of sand flies, such as the presence of trees, domestic animals and organic matter.

The traps were exposed from 4:00 pm to 8:00 am the next morning, monthly from February to December 2019, for two consecutive nights per month, in urban and rural areas. The captured specimens were placed in hemolysis tubes containing 70% alcohol, prepared, mounted on a slide [19] and identified according to the classification proposed by Young & Duncan (1994) [20]. The captured sandflies were deposited in the Collection of the Laboratory of Parasitology, Department of Biological Sciences, Federal University of Vales do Jequitinhonha and Mucuri.

## RESULTS

The municipality of Diamantina presented 8 autochthonous cases of visceral leishmaniasis in the period from 2016 to 2018, with 4 cases recorded in the urban area and 4 cases in the rural area. The disease prevailed in males (62.5%), with the majority of patients aged 0-9 years (25%) and a lethality rate of 37.5% (Table 1)

Table II shows the percentage of confirmed canine cases of VL and the distribution of human cases by area of residence in the municipality of Diamantina between 2016 and 2018. In this period, 166 out of 565 dogs analyzed presented positive serology for VL in the urban area, with an average percentage of 29.4%. In rural areas, 246 out of 1,388 dogs tested were seropositive for VL, with an average percentage of 29.9%. Of the 8 human cases, 4 were patients living in the urban area and 4 declared residence in the rural area (Table 2).

The phlebotomine fauna of Diamantina consisted of 10 species: *Lutzomyia carmelinoi* Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lutzomyia diamantinensis* Barata, Serra-e-Meira & Carvalho, 2012, *Lutzomyia evandroi* (Costa Lima & Antunes,

1936), *Lutzomyia ischyracantha* Falcão & Silva, 1962, *Lutzomyia oliveirai* Martins, Silva & Falcão, 1970, *Lutzomyia orestes* (Fairchild & Trapido, 1950), totaling 4,452 specimens, being 2,770 males (62%) and 1,682 females (38%). The rural area had the highest percentage of captured specimens (99.8%), with a predominance of *Lutzomyia longipalpis* (55.7%) (Table 3).

## DISCUSSION

In the last decades, the phenomenon of urbanization has been pointed out as the main responsible for the geographic expansion of the LV, mainly in the peripheries of urban areas of Brazilian cities [21,22,23]. However, the results shown in this work suggest that the VL is still in the process of urbanization in the municipality of Diamantina.

Considering the notification of human cases of VL in the rural area, and also the high occurrence of seropositive dogs and *Lu. longipalpis* in the peridomicile of residences in this area, our data indicate that the profile of transmission of VL in the municipality is mixed of the rural/urban type. In addition, other data that reinforces this hypothesis is the registration of human cases in the urban area, but in peripheral neighborhoods (Consolação, Cidade Nova and Palha), bordering the rural area.

Analyzing the profile of human cases according to the age group, it is noted that VL was more frequent in children under 10 years old (25%). This finding corroborates that found by other authors [24,25]. The lethality rate was 37.5%, unlike Silva et al. (2001) [10] and Queiroz et al. (2004) [26], who found a lethality of 11.5% and 10.2%, respectively. Further studies need to be undertaken to elucidate this high lethality found in the city.

The percentage of confirmed canine cases during the study period in urban and rural areas was 29.4% and 29.9%, respectively. However, it is important to emphasize that, in the present study, the canine survey was conducted on demand, and not as a census, as in other studies [27,28,29]. Thus, we believe that the prevalence of VL in this municipality is overestimated, considering that only dogs with any apparent sign/symptom have been subjected to the diagnosis.

In Minas Gerais State, as well as in other Brazilian states, the high density of *Lu. longipalpis* in urban areas has been evidenced by many authors [28,30,31]. This sand fly has been identified as the main vector of *Le. infantum chagasi* in Brazil for complying with the criteria established to be considered a competent vector [32]. Possibly, it is also the species responsible for the transmission of *Le. infantum chagasi* in Diamantina.

One of the characteristics of *Lu. longipalpis* is its high adaptive plasticity, being able to adapt easily to different habitats and climatic conditions [33,34]. Although it considered a highly urbanized species, in this study, this species was found in low numbers in the urban area and high density in the rural environment. In the literature, populations of *Lu. longipalpis* in less anthropized environments have also been reported [35,36].

Other data that deserves to be highlighted is the remarkable presence of *Lutzomyia whitmani*, one of the vectors of cutaneous leishmaniasis in Brazil, and mainly in the State of Minas Gerais [37,38]. In this work, this species was found in urban and rural areas, showing its ecological plasticity, as observed by Peterson & Shaw (2003) and Costa et al. (2007) [39,40].

*Lutzomyia pessoai* captured in this study in the rural area, is considered quite anthropophilic, being found frequently inside homes in endemic areas and has been

identified as a species suspected of transmitting American tegumentary leishmaniasis (ATL) in other locations [41]. As the municipality of Diamantina is endemic to ATL, the finding of *Lu. pessoai* and *Lu. whitmani* suggests that these are the species responsible for the transmission of dermatropic leishmanias in the region.

Another observation that accelerates the transmission of *Leishmania* sp. in the municipality is the constant presence of domestic animals, such as dogs, cats, rats, oxen, pigs and chickens close to homes (data not shown), which facilitates the attraction of sandflies and increases the possibility of vector/human contact, and, consequently, of leishmaniasis transmission.

Finally, the results of this work provided the first data on the epidemiological triad in the municipality of Diamantina. Our data suggest that VL in this area is in the process of urbanization, different from what has been happening in other urban centers. The occurrence of human cases, the high percentage of confirmed canine cases and the high density of *Lu. longipalpis* in the rural area reinforce the need for continuous epidemiological surveillance of VL in Diamantina.

## REFERENCES

1. Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006(123);353-356.
2. World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of WHO Expert Committee. Series WHO 1992(793);139-158.

3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 /1. ed. atual. - Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
4. Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. An Acad Bras Cienc. 2003(75);301-330.
5. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005(100);811-827.
6. Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. O Hospital. 1954(45);419-421.
7. Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RS, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985(79);223-226.
8. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcés LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002(186);1314-1320.



9. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002(18);399-405.
10. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001(96);285-291.
11. Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009(61);1035-1043.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
13. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.
14. Matos R, Garcia, RA. A população do Vale do Jequitinhonha. In: Souza JVA & Henriques MS. (Org.). Vale do Jequitinhonha: formação histórica, populações e movimentos. Belo Horizonte: UFMG/PROEX, 2010, p. 97-127.

15. Andrade CLT, Szwarcwald CL. Desigualdades sócio-espaciais da adequação das informações de nascimentos e óbitos do Ministério da Saúde, Brasil, 2000-2002. *Cad Saude Publ.* 2007(23);1207-16.
16. Victora CG, Aquino EM, Leal MC, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet.* 2011(377);1863-76.
17. Vieira EWR. Acesso e utilização dos serviços de saúde de atenção primária em população rural do Município de Jequitinhonha, Minas Gerais [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
18. Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005(38);70-72.
19. Langeron, M. 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine, Saint-Germain, Paris, 1.
20. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst.* 1994(54);1-881.

21. Nascimento MDS, Costa JML, Fiori BIP, Viana GM, Filho MSG, Alvim AC, et al. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996(29);233-240.
22. Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001(53);1-8.
23. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006(39);352-356.
24. Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *BioMed Res Int*. 2013(3);405083.
25. Coimbra VCS, Lima MS, Oliveira FM, Abreu WM, Ferreira JMT, Bezerra NPC. Leishmaniose visceral: perfil epidemiológico dos casos notificados no município de São Luís-MA, no período de 2014 a 2017. *Rev Bras Educ Saude*. 2019(9);87-93.
26. Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr*. 2004(8);141-146.

27. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Mayrink W, Vieira EP, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003(111);161-173.
28. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005(38);147-152.
29. Dias ES, Silva SR, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011(176);101-111.
30. Barata RA, França-Silva, Silva RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004(99); 481-487.
31. Lopes JV, Michalsky EM, Pereira NCL, Paula AJV, Lara-Silva FO, Lana RS, et al. Entomological studies in Itaúna, Brazil, an area with visceral leishmaniasis transmission: fauna survey, natural *Leishmania* infection, and molecular characterization of the species circulating in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 2019(56);1368-1376.

32. Killick-Kendrick R, Ward RD 1981. Ecology of *Leishmania*. Parasitology. 1981(82);143-152.
  
33. Costa PL, Dantas-Torres F, Silva FJ, Guimarães VCFV, Gaudêncio K, Brandão-Filho SP. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. Acta Trop. 2013(126);99-102.
  
34. Oliveira AM, Vieira CP, Dibo MR, Guirado MM, Rodas LAC, Chiaravalloti-Neto F. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* and human and canine cases of visceral leishmaniasis and evaluation of their expansion in the Northwest region of the State of São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2016(164);233-42.
  
35. Chagas AP, Soares DC, Sousa GCR, Viana RB, Rebelo JMM, Garcez LM. Aspectos ecológicos da fauna de flebotomíneos em focos de leishmaniose na Amazônia Oriental, Estado do Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2016(7);123-132.
  
36. Cerqueira RFV, Simões-Gomes FC, Sincurá YR, Santos T, Barata RA. Phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) in Rio Preto State Park, Southern Espinhaço Range, Minas Gerais, Brazil. Stud Neotrop Fauna Environ. 2017(53);1-6.
  
37. Andrade-Filho JD, Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA, et al. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). Cad Saude Publ. 1997(13);767-770.

38. Souza NA, Andrade-Coelho, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002(97);759-765.
39. Peterson AT, Shaw J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions and climate change effects. Int J Parasitol. 2003(33);919-931.
40. Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007(102);149-153.
41. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009(104);937-954.

**Table 1. Distribution of human VL cases according to age group, residence zone and lethality of the municipality of Diamantina/MG in the period from 2016 to 2018.**

Age group (years)	Urban area		Rural area		Total	%	Lethality
	♀	♂	♀	♂			
0 - 9	0	0	0	2	2	25	1
10 - 19	0	1	0	0	1	12.5	0
20 - 29	0	1	0	0	1	12.5	0
30 - 39	0	0	1	0	1	12.5	0
40 - 49	1	0	0	0	1	12.5	0
50 - 59	0	0	0	1	1	12.5	1
60 - 69	0	0	0	0	0	0	0
70 - 79	0	0	0	0	0	0	0
80 - 89	0	0	0	0	0	0	0
90 - 99	1	0	0	0	1	12.5	1
Sub-total	2	2	1	3			
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>		<b>4</b>		<b>8</b>	<b>100</b>	<b>3</b>

**Table 2. Percentage of confirmed canine cases and distribution of human cases of VL by residence area in the municipality of Diamantina/MG from 2016 to 2018.**

<b>Area</b>	<b>Localities</b>	<b>Dogs examined (N)</b>	<b>Dogs positive (N)</b>	<b>(%)</b>	<b>VL human cases</b>
Urban	Cidade Nova	11	5	45.5	2
	Consolação	29	12	41.4	1
	Palha	139	38	27.3	1
	Outros	386	111	28.7	-
	<b>Sub-total</b>	<b>565</b>	<b>166</b>	<b>29.4</b>	<b>4</b>
Rural	Jazida	36	12	8.3	2
	Maria Orminda	132	39	29.5	1
	Pinheiro	35	4	11.4	1
	Outros	620	191	30.8	-
	<b>Sub-total</b>	<b>823</b>	<b>246</b>	<b>29.9</b>	<b>4</b>
<b>TOTAL</b>		<b>1.388</b>	<b>412</b>	<b>29.6</b>	<b>8</b>

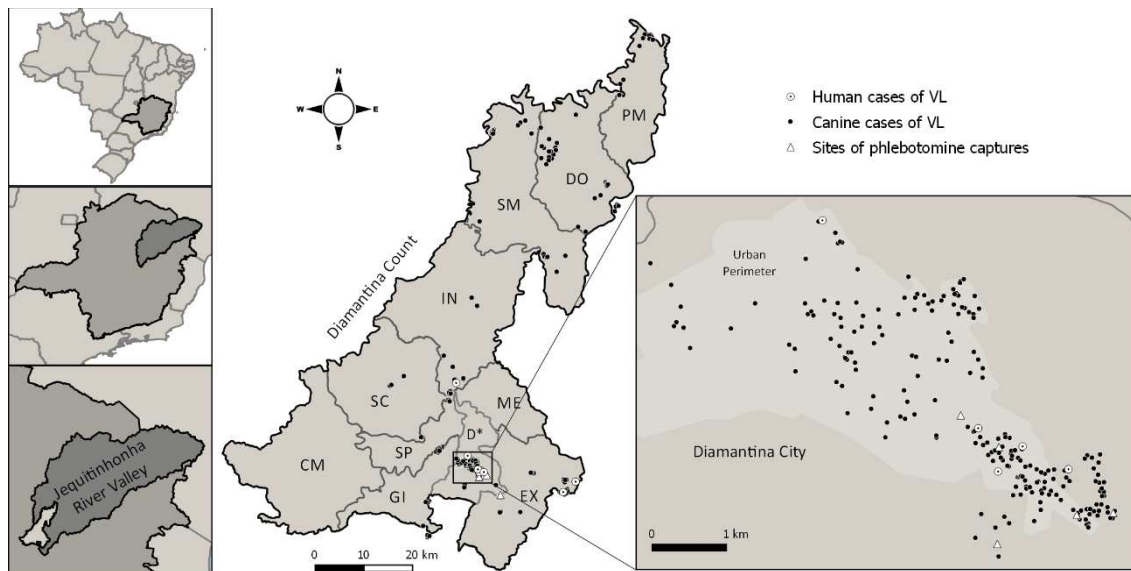


**Table 3. Phlebotomines sandflies captured with HP trap in Diamantina/MG according to species, sex and residence area in period between February to December 2019.**

Species	Urbana area		Rural area		Total	%
	♀	♂	♀	♂		
<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	0	0	0	1	1	0.02
<i>Lutzomyia carmelinoi</i>	0	0	0	6	6	0.13
<i>L. diamantinensis</i>	0	0	1	0	1	0.02
<i>L. evandroi</i>	1	0	58	53	112	2.52
<i>L. ischyraantha</i>	2	0	31	7	40	0.90
<i>L. longipalpis</i>	0	2	312	2,168	2,482	55.75
<i>L. oliveirai</i>	0	0	3	0	3	0.07
<i>L. orestes</i>	0	0	1	0	1	0.02
<i>L. pessoai</i>	0	0	32	32	64	1.44
<i>L. whitmani</i>	0	2	1,238	497	1,737	39.02
<i>Lutzomyia</i> spp.	1	0	2	2	5	0.11
Sub-Total	4	4	1,678	2,766		
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>		<b>4,444</b>		<b>4,452</b>	<b>100</b>

### Legends:

**Figure 1.** Geographic location of the municipality of Diamantina, Minas Gerais State (MG), Brazil inserted in Jequitinhonha Valley. Inset: Map of the municipality of Diamantina with district subdivision: Diamantina (D\*) (study area), Planalto de Minas (PM), Desembargador Otoni (DO), Senador Mourão (SM), Inhaí (IN), São João da Chapada (SC), Conselheiro Mata (CM), Sopa (SP), Guinda (GI), Mendanha (ME) and Extração (EX). In details: Distribution profile of human VL (white dots), canine VL (black dots) and sites of phlebotomine captures (triangles) in the municipality of Diamantina/MG.



## ANEXO B – E-mail com o aceite da revista ao Artigo desenvolvido com os dados coletados no período de 2016 a 2018.

16/11/2020

Email – Diogo Nascimento – Outlook

ENC: Yale Journal of Biology and Medicine has made a decision concerning your manuscript: Ecoepidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil)

Ricardo Andrade Barata <ricbarata@hotmail.com>

Sáb, 14/11/2020 13:57

Para: Diogo Nascimento <diogogouveiano@hotmail.com>

### Dr. Ricardo Andrade Barata

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

---

De: notifications@scholasticahq.com <notifications@scholasticahq.com> em nome de Devon Wasche <notifications@scholasticahq.com>

Enviado: quinta-feira, 1 de outubro de 2020 16:24

Para: RICARDO BARATA <ricbarata@hotmail.com>

Assunto: Yale Journal of Biology and Medicine has made a decision concerning your manuscript: Ecoepidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil)

Dear Dr. Barata,

Thank you for addressing our editors' and reviewers' comments and for re-submitting your manuscript entitled "Ecoepidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil)" to the Yale Journal of Biology and Medicine (YJBM). Your manuscript requires no further revisions and will be published in our June 2021 issue of YJBM. Your manuscript has been passed on to our Editorial Coordinator, Kate Woodford, who will contact you with a PDF proof of your manuscript to check. She will also send you a copyright form that must be signed and returned before the manuscript can be published. Please provide a second contact who can approve proofs if you anticipate being away and/or unreachable during this time to ensure that manuscripts are processed in time for publication.

YJBM wants to ensure that our journal is welcoming to minority scientists and reflects the diversity of the scientific community. In an effort to understand the representation and diversity of our authors and identify ways to improve, we invite you to complete this (<https://forms.gle/BUsoBbV4j3RuDP836>) voluntary self-identification

16/11/2020

Email – Diogo Nascimento – Outlook

form and to please share this form with your co-authors. Please note that providing this information is voluntary, and that the information you provide is confidential and anonymous.

Thank you very much for your submission. We hope to continue to work with you on future editions of YJBM!

Sincerely,  
The YJBM Editorial Board

---

## Publication Decision Details

---

### Manuscript Title

Ecoepidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil)

### Journal

Yale Journal of Biology and Medicine

### Publication Decision

Accept

[View details on Scholastica](#)

---



Livre de vírus. [www.avast.com](http://www.avast.com).